



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS EM EQUINOS:  
COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS

CATARINA BARBOSA DE BETTENCOURT CORREIA E ÁVILA CORRÊA  
HENRIQUES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Luísa Maria Freire Leal  
Mateus

Doutora Ana Catarina Balejo  
Mora Torres

Dr. Miguel Louro Bliebernicht

ORIENTADOR

Dr. Miguel Louro Bliebernicht

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Ressano Garcia  
Pardon Lamas

2019

LISBOA

---

EmbriO Vet



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS EM EQUINOS:  
COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS

CATARINA BARBOSA DE BETTENCOURT CORREIA E ÁVILA CORRÊA  
HENRIQUES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Luísa Maria Freire Leal  
Mateus

Doutora Ana Catarina Balejo  
Mora Torres

Dr. Miguel Louro Bliebernicht

ORIENTADOR

Dr. Miguel Louro Bliebernicht

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Ressano Garcia  
Pardon Lamas

2019

LISBOA

---

## Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, aos meus pais e irmãos, por todo o apoio ao longo da vida e especialmente durante este curso.

Ao meu marido, por me apoiar sempre e me motivar quando preciso.

Aos meus tios, tio Diogo e tia Ana, por me abrirem as portas da sua casa durante o meu longo período de estágio em Santarém, e por toda a paciência e carinho com que me receberam.

Ao meu orientador, Dr. Miguel Bliebernicht, pela oportunidade de estagiar na Embriovet e por toda a transmissão de conhecimento e experiências. Agradeço especialmente a possibilidade de desenvolver esta tese, com o seu enorme apoio. Sem a sua confiança nunca teria aprendido tanto durante o meu estágio.

Ao meu co-orientador, Professor Luís Lamas, pela oportunidade de estágio no Serviço de Cirurgia e Urgência de Equinos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (SCUE) e pela disponibilidade e ajuda na realização deste trabalho. O tempo passado no SCUE foi de enorme aprendizagem, muito devido à sua exigência e paciência de ensinar.

A toda a equipa da Embriovet, ao Filipe, à Teresa e à Maria Inês, pela vossa incansável ajuda e paciência, quer durante todo o meu estágio, como na parte prática desta tese, que muito contou com a sua participação e disponibilidade. Sem esta equipa, nunca conseguiria realizar este trabalho e, principalmente, nunca ficaria com tão boas memórias do tempo passado no Ribatejo.

Também a toda a equipa do Haras de La Gesse, que tão bem me recebeu, e principalmente à Dra. Ana Luísa Costa, pela sua disponibilidade durante toda a minha estadia em França.

À restante equipa do SCUE, Mariana, Teresa e Filipa, que não só tiveram uma enorme contribuição na minha aprendizagem durante o estágio, como o tornaram tão divertido. Obrigada por todas as recordações que levo do SCUE! E ainda, muito obrigada à equipa de enfermeiros e a todos os alunos voluntários, pela sua ajuda incansável.

Por fim, ao meu filho que aí vem, por me dar o empurrão final para acabar esta dissertação.



## CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS EM EQUINOS: COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS

Em caso de morte inesperada, acidente ou mesmo castração eletiva de um garanhão é possível recuperar e criopreservar espermatozoides viáveis da cauda do epidídimo (Bruemmer, 2006). Inclusivamente, o primeiro relato de um poldro nascido após inseminação artificial (IA) com sémen congelado foi o resultado de uma inseminação com espermatozóides epididimários (Barker & Gandier, 1957). Os espermatozóides da cauda do epidídimo têm algumas características diferentes em termos de refrigeração e criopreservação, pois são células que nunca contactaram com os restantes fluidos seminais, em comparação com espermatozóides obtidos de uma ejaculação. Neste trabalho pretende-se comprovar a eficácia de uma das técnicas de colheita de espermatozóides do epidídimo: a técnica do *flushing* retrógrado (Bruemmer, 2006), em testículos refrigerados a 5°C 24h após castração, bem como comparar o efeito de dois métodos de criopreservação na motilidade e viabilidade dos espermatozóides. Ainda, pretende-se efetuar a comparação da motilidade, pós-descongelção, e número de células espermáticas obtidas, entre a colheita de ejaculado pré-castração com vagina artificial e a colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo, no mesmo cavalo. Para tal, fez-se a recolha dos espermatozóides da cauda do epidídimo num total de 12 cavalos, entre os 3,5 e os 10 anos de idade, de diferentes raças; após colheita, criopreservou-se os espermatozóides de cada cavalo com dois diluidores de congelação para sémen de equino: Botucrio® (Bc) e Gent diluído de 1:1 com diluidor de leite desnatado (Gd). Em cinco destes cavalos, cinco ejaculados foram recolhidos pré-castração com vagina artificial e criopreservados. Obteve-se uma média de  $15688 \pm 2432$  milhões de espermatozóides recolhidos da cauda do epidídimo por cavalo ( $n=12$ ). Após descongelção, avaliou-se a motilidade, total (MT) e progressiva (MP), e a viabilidade, através de coloração com sondas fluorescentes e através do teste hipo-osmótico (HOST). Obteve-se uma MT e MP, respetivamente, de  $49,5 \pm 2,8\%$  e  $26,4 \pm 10,4\%$ , no grupo Bc, e de  $14,1 \pm 2,9\%$  e  $4,05 \pm 5,08\%$ , no grupo Gd. O número de espermatozóides viáveis, segundo o teste de coloração e HOST, respetivamente, foi de  $47,1 \pm 2,3\%$  e  $65,5 \pm 2,0\%$ , para o grupo Gd e  $40,7 \pm 2,0\%$  e  $50,6 \pm 1,5\%$ , para o grupo Bc. O diluidor de congelação Botucrio® obteve resultados satisfatórios na preservação da motilidade e viabilidade de espermatozóides epididimários. A motilidade dos espermatozóides epididimários e do ejaculado, pós-descongelção, foi semelhante em 3 de 5 cavalos e o número de espermatozóides obtidos por colheita da cauda do epidídimo foi de duas a dez vezes superior ao de um ejaculado.

**Palavras-chave:** espermatozóides, epidídimo, equino, sémen, criopreservação



## Abstract

### FREEZING OF EQUINE EPIDIDYMAL SPERM: COMPARISON BETWEEN TWO METHODS

In the event of unexpected death, catastrophic injury, or even elective castration, stallion sperm capable of fertilization can be recovered from the epididymal cauda and frozen for future use (Barker & Gandier, 1957; Bruemmer, 2006; Morris, Tiplady, & Allen, 2002). The first report of a foal born after artificial insemination with frozen semen was the result of an insemination with epididymal spermatozoa (Barker & Gandier, 1957). Epididymal spermatozoa have some different characteristics in terms of refrigeration and cryopreservation, because they never contacted other seminal fluids, compared to spermatozoa obtained in an ejaculation.

In this study we intend to prove the efficacy of the retrograde flushing technique in harvesting epididymal spermatozoa from the cauda epididymis, in refrigerated testicles at 5°C 24h after castration, as well as to compare two methods of cryopreservation. Finally, it is intended to compare the motility and number of sperm cells obtained between the ejaculate, collected using the artificial vagina, and the spermatozoa harvested from the epididymal cauda, on the same horse. For this, the spermatozoa were harvested from the epididymis in 12 horses, from 3.5 to 10 years of age, of different breeds; and the semen of each horse was cryopreserved with two freezing extenders for equine semen: Botucio® (Bc) and Gent diluted 1: 1 with skim milk-based extender (Gd). In five of these horses, several ejaculates were previously collected with artificial vagina and cryopreserved. An average of  $15688 \pm 2432$  million sperm was collected from the tail of the epididymis per horse. After thawing, total and progressive motility was assessed for both groups, as well as the sperm viability obtained by two methods: staining with fluorescent probes and by the hypo-osmotic swelling test (HOST). A total and progressive motility was obtained, respectively, of  $49.5 \pm 2.8 \%$  and  $26.4 \pm 10.4 \%$ , in group Bc, and of  $14.1 \pm 2.9 \%$  e  $4.05 \pm 5.08 \%$ , in group Gd. The number of viable spermatozoa, according to the staining test and HOST, respectively, was  $47.1 \pm 2.3\%$  and  $65.5 \pm 2.0\%$ , for the Gd group and  $40.7 \pm 2.0\%$  and  $50.6 \pm 1.5\%$  for the Bc group. The freezing extender Botucio® obtained satisfactory results in the preservation of the motility and viability of epididymal spermatozoa. Sperm motility of ejaculate and epididymal semen, post-thaw, was similar in 3 of 5 horses and the number of spermatozoa harvested from the cauda epididymis was two to ten times superior to the obtained in one ejaculate.

**Key-words:** *equine, epididymal, spermatozoa, semen, frozen*





## Breve descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio

Durante o ano letivo de 2017/2018 tive o prazer de estagiar em dois locais, em áreas bastante distintas. Desta forma pude ampliar a minha experiência dentro do trabalho com equinos.

No Serviço de Cirurgia e Urgência de Equinos (SCUE), na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, tive a oportunidade de participar em diversos casos de urgência, consultas, internamentos ou cirurgia. Nas urgências, aprendi a receber os pacientes, avaliar o seu estado, executar exames auxiliares de diagnóstico e discutir uma estratégia de ação. Pude assistir a diferentes consultas de especialidade, incluindo ortopedia, gastroenterologia, pneumologia e medicina interna. Fiz o seguimento dos inúmeros cavalos internados, em cuidados intensivos ou não, cumprindo exames clínicos periódicos e o plano de tratamento indicado. Assisti a cirurgias, desde cólicas, artroscopias, orquiectomias, entre outras, em que participei quer na preparação do paciente, da sala e do material, quer como ajudante do cirurgião ou do anestesista.

No SCUE, tive a oportunidade de aprender como funciona um hospital universitário de equinos, na sua componente clínica e de formação.

Na Embriovet, uma clínica especializada em reprodução de equinos, em Salvaterra de Magos, pude contactar com a realidade do trabalho de campo e de laboratório, tanto durante a época reprodutiva como fora desta. Durante a época reprodutiva, assisti e desempenhei inúmeros exames reprodutivos de éguas, tanto na clínica como no campo, e aprendi a identificar as fases do ciclo reprodutivo e a discutir o plano de ação para cada égua, consoante os objetivos estipulados. Assisti diariamente à execução de técnicas como a inseminação artificial, quer com sémen fresco como com sémen congelado, e a transferência de embriões. Tive, ainda, a oportunidade de participar em casos de neonatologia, acompanhando os exames auxiliares e o raciocínio clínico para obter um diagnóstico, seguido invariavelmente por uma maratona de cuidados intensivos, característicos destes casos. Também pude acompanhar o trabalho com garanhões, em que executei colheitas de sémen e posterior processamento (e envio) do mesmo. Participei, ainda, em orquiectomias eletivas em diversos cavalos. No laboratório, aprendi a criopreservar sémen e a analisá-lo ao microscópio e realizei, ainda, a colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo de vários cavalos. Por último, participei em diversas urgências no campo, na sua maioria sob a forma de cólicas ou traumatismos.

Foi um ano em que aprendi muito na área dos equinos, ficando ainda muito mais por aprender.



## Índices

### Índice Geral

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>i</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>Breve descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índices</b> .....	<b>ix</b>
<i>Índice Geral</i> .....	<i>ix</i>
<i>Índice de Figuras</i> .....	<i>xi</i>
<i>Índice de Tabelas</i> .....	<i>xii</i>
<b>Abreviaturas e Símbolos</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Anatomia e Fisiologia do Testículo e Epidídimo no Cavalo</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. <i>Testículo</i> .....	1
1.1.2. <i>Epidídimo</i> .....	3
1.1.3. <i>Espermatogénese</i> .....	4
1.1.4. <i>Maturação e Armazenamento no Epidídimo</i> .....	6
1.1.5. <i>O Espermatozóide</i> .....	8
<b>1.2. Técnicas de Colheita de Espermatozóides do Epidídimo de Equino</b> .....	<b>9</b>
1.2.1. <i>Colheita e armazenamento dos testículos e epidídimos</i> .....	10
1.2.2. <i>Colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo</i> .....	11
<b>1.3. Criopreservação de Espermatozóides do Epidídimo de Equino</b> .....	<b>12</b>
1.3.1. <i>Crioprotetores penetrantes de membrana</i> .....	13
1.3.2. <i>Adição de plasma seminal aos espermatozóides epididimários</i> .....	14
1.3.3. <i>Fertilidade com espermatozóides da cauda do epidídimo de equino criopreservados</i> .....	15
<b>1.4. Análise de Sémen</b> .....	<b>16</b>
1.4.1. <i>Motilidade</i> .....	16
1.4.2. <i>Testes de Função e Integridade de Membrana Plasmática</i> .....	17
1.4.2.1. <i>Teste de Coloração Vital com Sondas Fluorescentes</i> .....	17
1.4.2.2. <i>Teste Hipo-osmótico</i> .....	18
<b>2. Trabalho Experimental</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1. Objetivos</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2. Materiais e métodos</b> .....	<b>20</b>

2.2.1.	<i>Desenho experimental</i> .....	20
2.2.2.	<i>Orquiectomia e armazenamento dos testículos</i> .....	20
2.2.3.	<i>Colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo</i> .....	21
2.2.5.	<i>Descongelção e análise dos espermatozóides do epidídimo</i> .....	24
2.2.5.1.	<i>Motilidade</i> .....	25
2.2.5.2.	<i>Teste de coloração com sondas fluorescentes</i> .....	25
2.2.5.3.	<i>Teste de turgescência hipo-osmótico (HOST)</i> .....	26
2.2.6.	<i>Análise do sêmen obtido por colheita com vagina artificial</i> .....	27
2.2.7.	<i>Análise estatística</i> .....	28
<b>2.3.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>28</b>
2.3.1.	<i>Idade, parâmetros testiculares e número de espermatozóides recolhidos da cauda do epidídimo</i> .....	28
2.3.2.	<i>Parâmetros de avaliação nos espermatozóides epididimários</i> .....	30
2.3.3.	<i>Comparação entre espermatozóides do ejaculado e da cauda do epidídimo</i> .....	31
<b>2.4.</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>33</b>
<b>3.</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>36</b>
<b>4.</b>	<b>Bibliografia</b> .....	<b>38</b>

## Índice de Figuras

Figura 1 - Imagem representativa da anatomia do testículo e epidídimo. Adaptado de Amann (2011). .....	3
Figura 2 - Representação de um espermatozóide de equino. Retirado de Varner e Johnson (2011). .....	8
Figura 3 - Alterações morfológicas típicas de turgescência, observadas em sémen de equino após congelamento/ descongelamento. Imagem retirada de Neild et al. (1999). .....	19
Figura 4 – Testículo antes do processamento, com uma pinça hemostática a laquear o ducto deferente. ....	21
Figura 5 – Testículo após dissecação do ducto epididimário, que se encontra estendido e laqueado por uma pinça. ....	21
Figura 6 - Imagem do processo de <i>flushing</i> da porção dissecada da cauda do epidídimo. ..	22
Figura 7 – Tubo de <i>falcon</i> contendo os espermatozoides e diluidor, após <i>flushing</i> . ....	23
Figura 8 - Amostras de sémen após descongelamento mantidas numa placa aquecida até análise. ....	24
Figura 9 - Imagem de campo microscópico sob fluorescência, após coloração com Kit Fluovit, numa ampliação de 200x. ....	26
Figura 10 - Campo microscópico da avaliação do HOST, sob ampliação de 600x. ....	27
Figura 11 – A) Correlação entre o peso dos testículos e a idade em meses. B) Correlação entre o número de espermatozoides obtidos por indivíduo e a idade em meses. ....	29
Figura 12 – A) Correlação entre o peso do par de testículos e o número de espermatozoides obtidos. B) Correlação entre o volume da porção dissecada de epidídimo e o número de espermatozoides obtidos por epidídimo. ....	30
Figura 13 – A) Comparação da motilidade total e progressiva para espermatozoides do ejaculado e da cauda do epidídimo. B) Comparação do número de espermatozoides obtidos pelos dois métodos de colheita. ....	32

## *Índice de Tabelas*

Tabela 1 - Reservas espermáticas num equino adulto (5-16 anos), segundo resultados de Amann et al. (1979), retirado de Amann (2011). .....	4
Tabela 2 – Resultados obtidos de idade, peso dos testículos, volume de epidídimo e número de espermatozóides obtidos por recolha da cauda do epidídimo. ....	29
Tabela 3 - Resumo dos valores obtidos dos parâmetros seminais analisados pré e pós-congelação para cada grupo: Botucrio® (Bc) e Ghent diluído (Gd). .....	31
Tabela 4 - Valores pós-descongelção de motilidade e número de espermatozóides obtidos por colheita da cauda do epidídimo e num ejaculado. ....	32

## Abreviaturas e Símbolos

®	Marca registrada
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ATP	Adenosina Trifosfato
Bc	Botucrio® (marca Botupharma®)
CASA	Computer-Assisted Sperm Analysis
CFDA	Diacetato de Carboxifluoresceína
DMF	Dimetilformamida
EB	Brometo de Etídio
EG	Etilenoglicol
EH	Etídio Homodimérico-1
Fluo-	Espermatozóides inviáveis segundo teste de coloração com sondas fluorescentes
Fluo+	Espermatozóides viáveis segundo teste de coloração com sondas fluorescentes
G	Gauge
g	Grama
Gd	Gent (marca Minitube®) diluído (1:1 com diluidor de leite)
GLY	Glicerol
h	Horas
HOST	Hipoosmotic swelling test
HOST-	Espermatozóides inviáveis segundo HOST
HOST+	Espermatozóides viáveis segundo HOST
IA	Inseminação artificial
ICSI	<i>Intracytoplasmatic sperm injection</i>
MF	Metilformamida
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mOsm	Miliosmol
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
°C	Graus Celsius
<i>p</i>	Significância
PI	Iodeto de Propídio
<i>r</i>	Correlação de Spearman
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
s	Segundos



Spz	Espermatozoides
ToPro-3	Monómero de Iodeto de Benzotiazólio-4-quinolinio
TOTO	Dímero de Cianina
μl	Microlitro
μm	Micrómetro

## 1. Introdução

### 1.1. Anatomia e Fisiologia do Testículo e Epidídimo no Cavalo

#### 1.1.1. Testículo

Os testículos são as gónadas masculinas e funcionam como órgão gametogénico e endócrino. Estão localizados fora da cavidade abdominal, dentro do escroto, uma bolsa que envolve os testículos, epidídimos e cordões espermáticos, e que tem a função de proteção e termorregulação. O testículo de um garanhão após atingir a puberdade pode medir, em média, 80-140 mm de comprimento, 50-80 mm de largura e pesar cerca de 225g (Amann, 2011). No entanto, a idade, época do ano e a raça podem afetar o seu diâmetro (Little & Holyoak, 1992). O parênquima testicular é composto por um grande número de túbulos seminíferos (*tubuli seminiferi contorti*) e tecido intersticial. Os túbulos seminíferos são constituídos por epitélio seminífero (*epithelium spermatogenicum*), que consiste em diferentes tipos de células germinativas (*cellulae spermatogonicae*) e células de Sertoli, e são delimitados por uma lamina própria contendo fibroblastos, células mioídes (células especializadas de músculo liso) e laminina (Amann, 2011). As células de Sertoli são de grande importância pois fornecem proteção e nutrição para as células germinativas e são responsáveis pelo controlo do ciclo germinativo, na medida em que rodeiam as células germinativas (exceto as espermatogónias) e formam complexos entre si, que são a base estrutural da barreira hemato-testicular (Little & Holyoak, 1992). Assim, as células de Sertoli impedem o contacto das células germinativas mais diferenciadas com o sangue, protegendo-as do sistema imunitário do cavalo. Estes complexos dividem o epitélio em duas zonas funcionais distintas – zona basal (na periferia) e zona adluminal (Amann, 2011). As células mioídes (miofibroblastos), através de contrações peristálticas, ajudam na evacuação do conteúdo luminal para a rede *testis*, sendo que, para além de fornecerem integridade estrutural ao túbulo, também participam na regulação da espermatogénese e da função testicular (Maekawa, Kamimura, & Nagano, 1996).

O interstício é constituído por tecido conjuntivo, fibroblastos, linfócitos, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e células de Leydig (Amann, 2011). As células de Leydig são responsáveis pela produção de testosterona e são o componente maioritário do interstício testicular (Johnson & Neaves, 1981).

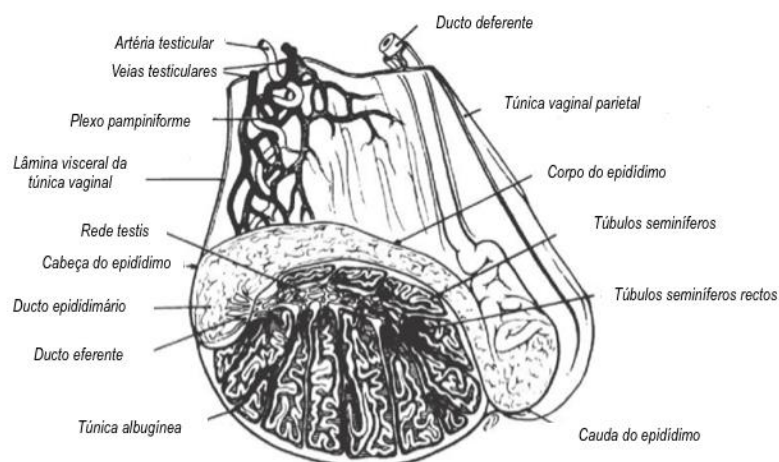
O testículo é delimitado por uma camada de tecido resistente rico em colagénio, a túnica albugínea, cujas trabéculas penetram no parênquima testicular, dividindo-o em lóbulos. Em cada lóbulo, os túbulos seminíferos, organizados em novelos, convergem para o mediastino testicular, formando os túbulos retos (*tubuli seminiferi recti*), que vão convergir na rede

testicular (*rete testis*), nos dois terços craniais do testículo (Amann, Johnson, & Pickett, 1977). Os túbulos retos da rede testicular penetram a túnica albugínea e formam uma rede extra-testicular, que se funde a um dos 13 a 15 ductos eferentes (*ductuli efferentes testis*) que, por sua vez, se vão unir ao ducto epididimário (*ductus epididymidis*) (Hemeida, Sack, & McEntee, 1978).

Sobre a túnica albugínea, e fundida a esta, encontra-se uma camada de tecido rico em colagénio associado a fibras musculares lisas, denominada de lâmina visceral da túnica vaginal ou *tunica vaginalis propria* (Sisson, Grossman, & Getty, 1975). A lâmina parietal da túnica vaginal, ou *tunica vaginalis communis* (Sisson et al., 1975), é uma continuação do peritoneu parietal que passa através do canal inguinal e recobre o testículo, epidídimo e cordão espermático (*funiculus spermaticus*) e encontra-se separada da lâmina visceral por um espaço, contínuo com a cavidade peritoneal, que contém uma pequena quantidade de fluído seroso que serve de lubrificante, permitindo o movimento dos testículos dentro da túnica vaginal. Sobre esta, da camada mais interna para a externa encontram-se: a fáscia escrotal, composta por tecido conjuntivo laxo que permite grande mobilidade dos testículos dentro do saco escrotal; a túnica dartos, composta por fibras de músculo liso interpostas com tecido conjuntivo e que controlam o relaxamento do saco escrotal; e a pele, contendo glândulas sebáceas e sudoríparas que ajudam na termorregulação (Amann, 2011). Assim, o saco escrotal é constituído por quatro camadas de tecido, desde a túnica vaginal (parietal) até à pele; embora, para alguns autores, a túnica vaginal seja parte integrante do testículo (Amann, 2011).

A descida testicular até uma posição escrotal garante a temperatura ideal no testículo para que ocorra a espermatogênese. Os testículos fetais são originários da crista gonadal do rim do embrião (mesónefro) no início da gestação. Para garantir uma posição escrotal, estes devem atravessar a cavidade abdominal e passar pelo anel inguinal interno geralmente entre os 300 dias de gestação e os 10 dias depois do nascimento (Bergin, Gier, Marion, & Coffman<sup>5</sup>, 1970). Após esse tempo, alterações fibróticas nos anéis internos impedem a sua passagem resultando num testículo retido abdominalmente, condição denominada criptorquismo (Bergin et al., 1970). Em alguns casos, os testículos passam pelos anéis internos perto do nascimento, mas permanecem inguinais por semanas ou meses antes de entrar no escroto (Bergin et al., 1970).

Figura 1 - Imagem representativa da anatomia do testículo e epidídimo. Adaptado de Amann (2011).



### 1.1.2. Epidídimo

O epidídimo localiza-se na superfície dorsal do testículo, dentro do escroto, e é composto por três zonas distintas: cabeça (*caput*), corpo (*corpus*) e cauda (Figura 1). A cabeça está aderente ao testículo e localiza-se no seu polo cranial, lateralmente ao cordão espermático, com uma forma de 'J' achatado. Continua como corpo do epidídimo, adquirindo uma forma cilíndrica, na face dorsal do testículo. A cauda localiza-se no seu polo caudal, com uma forma globosa. Na cabeça do epidídimo, os ductos da rede extra-testicular convergem num único ducto, o ducto epididimário (figura 1), com cerca de 70 a 80 metros de comprimento no cavalo (Little & Holyoak, 1992). Este percorre todas as porções do epidídimo, estendendo-se, como ducto deferente (figura 1), desde a porção terminal da cauda do epidídimo, pelo cordão espermático, até à uretra pélvica (Amann et al., 1977).

De um ponto de vista funcional, no epidídimo ocorre a maturação e armazenamento dos espermatozóides que abandonam o testículo, sendo esta função essencial para que ocorra fertilização, visto que os espermatozóides são inférteis ao abandonar o testículo, mas férteis quando recolhidos da cauda do epidídimo (Amann, Hammerstedt, & Veeramachaneni, 1993; Cooper, 2012; Johnson, Amann, & Pickett, 1980)

O processo de maturação espermática inclui a aquisição de capacidade de fertilização e motilidade progressiva dos espermatozóides, bem como alterações na sua estrutura, membrana plasmática e metabolismo. O epitélio dos ductos eferentes e da porção inicial da cabeça estão envolvidos na reabsorção de fluido e solutos das secreções testiculares, de forma a concentrar os espermatozóides; as restantes porções da cabeça e corpo atuam na maturação dos espermatozóides ao secretarem substâncias específicas no seu epitélio; e o

segmento terminal, composto pela cauda do epidídimo e porção proximal do ducto deferente estão envolvidos no armazenamento de espermatozóides férteis (Amann, 2011).

As reservas espermáticas extra-gonadais encontram-se distribuídas pelo ducto epididimário e ducto deferente, sendo que a zona da cauda do epidídimo é o principal local de armazenamento de espermatozóides, conforme apresentado na Tabela 1 (Amann, Thompson, Squires, & Pickett, 1979). Segundo Amann et al. (1979), as duas caudas de epidídimo de um garanhão adulto (5 –16 anos), em descanso sexual, contêm cerca de 54 bilhões de espermatozóides (Tabela 1), ou 61% do número total de espermatozóides presentes nos ductos de condução seminal.

Tabela 1 - Reservas espermáticas num equino adulto (5-16 anos), segundo resultados de Amann et al. (1979), retirado de Amann (2011).

Segment of excurrent duct	Spermatozoa in both sides (10 <sup>9</sup> )	Relative distribution (%)
Caput epididymidis	12	13
Corpus epididymidis	17	19
Cauda epididymidis	54	61
Deferent duct	4	2
Ampulla of deferent duct	2	2

### 1.1.3. Espermatogénese

A espermatogénese é o processo que resulta na formação dos gametas masculinos, os espermatozóides (células haploides) a partir de células precursoras diploides, as espermatogónias. No cavalo, a espermatogénese tem a duração de 57 dias (Swierstra, Pickett, & Gebauer, 1975) e compreende três etapas distintas. Ou seja, em 57 dias uma espermatogónia consegue originar vários espermatozóides, que são libertados na rede *testis*. Num estudo de Swierstra et al. (1975), injetou-se o radioisótopo [3H] timidina nas artérias testiculares de seis garanhões, que foram castrados em alturas diferentes pós-injeção e cujos testículos foram avaliados histológica e radiograficamente, possibilitando o estudo do ciclo espermatogénico. Observou-se que um novo ciclo se inicia a cada 12,2 dias e que o tempo de vida dos espermátócitos primários foi de 19,0 dias, o dos espermátócitos secundários foi de 0,7 dias e o dos espermátídios foi de 18,8 dias.

Na espermatocitogénese, as espermatogónias, presentes no epitélio basal dos túbulos seminíferos, sofrem divisões mitóticas que permitem repor a sua população ou, por diferenciação, originar espermátócitos primários (diploides) que migram em direção ao compartimento *ad-luminal* dos túbulos seminíferos. No cavalo, existem cinco subtipos de espermatogónias, consoante o seu grau de diferenciação e características morfológicas (A1,

A2, A3, B1, B2), sendo as espermatogónias tipo B2 as que irão originar os espermatócitos primários (Johnson, 1991). O número de cada subtipo de espermatogónias numa dada secção do tubo seminífero varia consoante a fase do ciclo espermatogénico. De igual forma, a quantidade de cada subtipo de células também varia com a estação do ano. Na época natural de reprodução, o número total de espermatogónias por testículo e o rendimento de espermatogónias B2 por espermatogónia A1 é maior. No entanto, o número de espermatogónias B2 é tão grande que muitas degeneram ao invés de produzirem dois espermatócitos primários viáveis, embora este facto não altere o rendimento final e, durante a época reprodutiva, a divisão do número mais elevado de espermatogónias A1 produz significativamente mais espermatócitos primários do que fora desta temporada (Johnson, 1991).

A divisão citoplasmática das células esperáticas, durante as divisões mitóticas, é frequentemente incompleta, resultando em células filhas que permanecem conectadas por pontes intracitoplasmáticas, originando um sincício, e possibilitando o seu desenvolvimento síncrono ao longo da espermatogénese (Clermont, 1972). A espermatocitogénese produz uma superabundância de espermatogónias e a degeneração das células germinativas é um mecanismo importante para reduzir o seu rendimento a um número gerível de espermatócitos (Johnson, Griffin, & Martin, 2011).

Após conclusão da fase mitótica, os espermatócitos primários, originados a partir das espermatogónias tipo B2, sofrem uma diferenciação, visível em termos do tamanho nuclear e da aparência da cromatina. Os espermatócitos primários pré-leptotenos, com núcleos em interfase, encontram-se no compartimento basal (abaixo das junções entre células de Sertoli) e migram através da barreira hemato-testicular para o compartimento *ad-luminal* no início da fase leptoteno da primeira divisão meiótica, em que os grânulos de cromatina se organizam e tornam-se filamentosos, assumindo a configuração morfológica característica desta fase (Clermont, 1972). Segue-se a fase zigoteno, na qual se dá o emparelhamento dos cromossomas homólogos, com troca de informação genética. O volume nuclear aumenta progressivamente e os cromossomas tornam-se mais compactos e entram na fase de paquíteno. De seguida, os espermatócitos entram em fase de diploteno durante a qual os cromossomas se separam parcialmente. Finalmente o núcleo passa por metafase, anafase e telofase da primeira divisão meiótica, originando os espermatócitos secundários. Estas células têm uma vida curta e, sem que haja duplicação do ADN, entram na segunda divisão meiótica, resultando na formação de espermatídios haploides (Clermont, 1972).

Por último, ocorre a espermiogénese, que compreende a diferenciação dos espermatídios recém-formados, caracterizados por um núcleo pequeno e esférico, um conjunto organelos citoplasmáticos (i.e., a zona de Golgi), mitocôndrias e centríolos; em espermatozóides, células altamente especializadas constituídas por uma cabeça alongada com um núcleo condensado, uma bolsa contendo enzimas penetrativas (acrossoma) e uma cauda, que

confere motilidade à célula. A maturação celular que ocorre nesta etapa resulta de um conjunto de processos.

Na fase de Golgi, o complexo de Golgi produz pequenos grânulos, denominados de vesículas pró-acrossômicas, que coalescem para formar uma única vesícula acrossômica, intimamente ligada à superfície do núcleo (Clermont, 1972). Ocorre a expansão da vesícula acrossômica sobre a superfície nuclear, denominada de fase do capuz. Enquanto o capuz acrossômico se forma num pólo do núcleo, os centríolos migram para o pólo oposto junto à membrana nuclear onde o centríolo distal irá dar origem à formação do axonema (Clermont, 1972). Durante a fase do acrossoma o núcleo e sistema acrossômico sofrem uma rotação em direção à membrana basal do túbulo seminífero, enquanto que o flagelo em desenvolvimento se alonga em direção ao lúmen. O núcleo desloca-se para a periferia do citoplasma e torna-se mais alongado e achatado enquanto que a cromatina começa a condensar e as histonas são substituídas por proteínas específicas do espermatozóide, protaminas, ricas em arginina e cisteína (Clermont, 1972). Na fase de maturação ocorre a formação do flagelo e peça intermédia. Surge a manchete, um organelo transitório composto por microtúbulos dispostos numa bainha, que se forma na região caudal do núcleo e se estende até ao flagelo, contribuindo na sua formação; e um anel que migra através do flagelo até ao local de junção entre a peça intermédia e a principal (Johnson, Griffin, & Martin, 2011). A peça intermédia compreende a zona entre os centríolos e o anel (*annulus*) que forma a sua extremidade caudal, em torno da qual as mitocôndrias se acumulam (Johnson, Griffin, & Martin, 2011). Muito do citoplasma existente ao longo destas estruturas flui em direção ao núcleo e separa-se da célula, formando um corpo residual, e uma pequena parte permanece junto à base da cabeça do espermatozóide como forma de gota citoplasmática (Johnson et al., 2011).

Os espermátídios são libertados no lúmen dos túbulos seminíferos, num processo denominado espermição, e encaminhados para os túbulos da rede *testis*, onde depois prosseguem para os ductos extra-gonadais para maturação e armazenamento. Os espermatozoides não estão totalmente maduros até adquirirem motilidade, fertilidade e capacidade de induzir o desenvolvimento embrionário normal. O espermatozóide que sai dos ductos eferentes é imóvel (Johnson et al., 1980) e incapaz de fertilizar, pelo que ocorre a maturação dos espermatozoides na cabeça e no corpo do epidídimo.

#### 1.1.4. Maturação e Armazenamento no Epidídimo

A maturação das células espermáticas que abandonam o testículo ocorre predominantemente na zona da cabeça e corpo do epidídimo, sendo que a zona da cauda é responsável pela manutenção e armazenamento de espermatozoides férteis (Amann et al., 1993). O tempo médio de trânsito de espermatozoides através do epidídimo do garranhão é

de 8 a 11 dias, sendo que o tempo de passagem pelos segmentos da cabeça e corpo dura 4 dias e não é afetado pela frequência de ejaculação, idade ou estação do ano (Swierstra et al., 1975), enquanto que o tempo de trânsito através da cauda do epidídimo pode ser alterado pela frequência de ejaculação (Amann et al., 1979). Os espermatozóides são imoveis ao entrar no epidídimo e não ganham motilidade até atingirem a zona distal do corpo (Johnson et al., 1980). Como tal, o movimento de espermatozóides através do epidídimo é atribuído principalmente a contrações rítmicas da musculatura lisa que envolve o ducto epididimal (Amann et al., 1993).

Os espermatozóides praticamente não têm capacidade biosintética, pelo que a composição do fluido luminal que envolve as células espermáticas é essencial na sua maturação e resulta da secreção de enzimas, proteínas e iões, em conjunto com a reabsorção de água e outros solutos, pelo epitélio epididimal (Amann et al., 1993). À medida que os espermatozóides vão progredindo no ducto, passam por diferentes '*pools*' de fluido luminal que vão desencadear alterações na membrana e metabolismo dos mesmos. É o conjunto destes processos que fornece à célula a capacidade de percorrer o trato reprodutivo feminino, formar um pronúcleo masculino funcional, possuir um acrossoma capaz de penetrar a zona pelúcida e ainda uma membrana plasmática capaz de se fundir com a membrana do oócito. Assim, a maturação espermática inclui um conjunto de alterações resumidas de seguida.

A nível nuclear, a modificação do complexo ADN-proteína do núcleo é essencial para minimizar a probabilidade de degradação prematura, mas maximizar a probabilidade de descondensação oportuna levando à formação de um pronúcleo masculino funcional (Bedford, 1974), sendo que o citoplasma do oócito é o único meio biológico conhecido que contém enzimas capazes de superar a estabilidade desse complexo e induzir a descondensação do ADN masculino (Amann et al., 1993). O genoma haploide do espermátídio codifica nucleoproteínas específicas (protaminas), que predominam durante a maturação dos espermatozóides no epidídimo. Os resíduos de cisteína desta proteína estabelecem ligações dissulfureto intermoleculares que resultam na compactação e estabilização do ADN (Varner & Johnson, 2011).

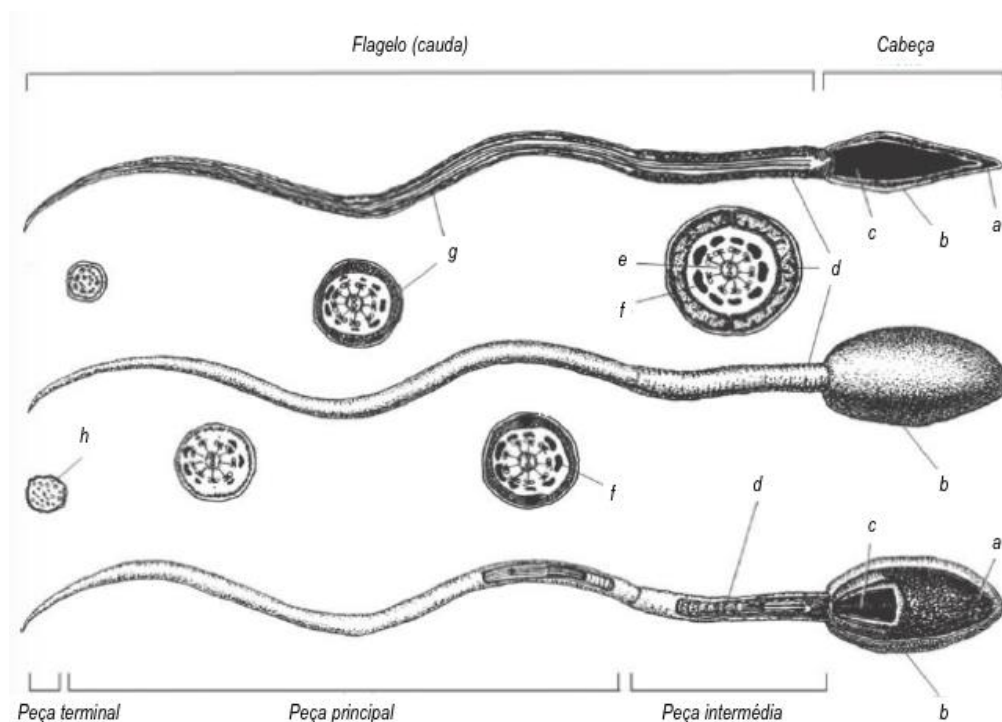
Outro aspeto essencial é a aquisição de motilidade espermática, que depende da permeabilidade das membranas plasmática e mitocondrial, que controlam o fluxo de iões, substratos e metabolitos associados à produção de ATP e conversão dessa energia em contrações dos braços de dineína e deslizamento dos microtúbulos das fibras axonemais, capazes de gerar o movimento flagelar da cauda dos espermatozóides. No processo de maturação ocorrem alterações que facilitam estes processos, nomeadamente a remodelação da membrana (Jones, 1998), mitocôndrias e componentes microtubulares das partes média e principal do espermatozóide, de forma a otimizar a produção de ATP e resultar em motilidade progressiva (Amann et al., 1993). Ocorrem, ainda, alterações nas



glicoproteínas a nível da superfície da membrana plasmática, induzidas por enzimas secretadas por células epiteliais, que permitem a sobrevivência prolongada do espermatozóide dentro do trato reprodutivo feminino e a modificação da mesma para formar locais de ligação com a membrana do oócito (Jones, 1998). Por fim, verifica-se a modificação da membrana acrossomal para uma estrutura estável, capaz de isolar os conteúdos acrossomais até que haja contacto com a zona pelúcida (Abou-Haila & Tulsiani, 2000) .

#### 1.1.5. O Espermatozóide

Figura 2 - Representação de um espermatozóide de equino. Adaptado de Varner e Johnson (2011).



Legenda: (a) acrossoma; (b) membrana plasmática; (c) núcleo; (d) mitocôndrias; (e) axonema; (f) fibra densa exterior; (g) bainha fibrosa; (h) microtúbulos axonómicos.

O espermatozóide, representado na figura 2, é tipicamente dividido em duas zonas: a cabeça e o flagelo, ou cauda (Varner & Johnson, 2011). Atualmente, muitos autores dividem o espermatozóide em: cabeça, peça de ligação ou pescoço, e cauda (Toshimori & Eddy, 2014). A cabeça contém o núcleo, acrossoma e uma pequena quantidade de citoplasma, assim como algumas estruturas de citoesqueleto organizadas. O flagelo pode ser subdividido em: peça de ligação (dependendo se é ou não tido como parte do cauda), peça intermédia, peça principal e peça terminal (Varner & Johnson, 2011). O comprimento médio

de um espermatozóide equino é de 61-86  $\mu\text{m}$  e a largura máxima da cabeça 2,9-3,9  $\mu\text{m}$  (Cummins & Woodall, 1985).

A cabeça do espermatozóide equino tem uma forma elíptica, achatada dorsoventralmente, e mais larga na zona posterior do que na porção apical. O núcleo ocupa a maior parte do espaço da cabeça e contém o material genético paterno, sob a forma de cromatina altamente condensada. Encontra-se rodeado por um envelope nuclear semelhante ao encontrado nas células somáticas: dois folhetos justapostos, um interno e outro externo, cada um constituído por uma bicamada fosfolipídica (Varner & Johnson, 2011). O acrossoma é um organelo que cobre os dois terços craniais do núcleo. Dispõe de uma membrana acrossomal interna, contínua com a membrana externa, e que delimita um espaço que contém uma matriz constituída por várias enzimas hidrolíticas, entre as quais glico-hidrolases ácidas, proteases, esterases, fosfatase ácida e arilsulfatases (Abou-Haila & Tulsiani, 2000). A ligação entre o flagelo e a cabeça ocorre a nível da lâmina basal, localizada entre o pescoço do espermatozóide e a base do núcleo. A concavidade na base da cabeça do espermatozóide que contém a placa basal é conhecida como fossa de implantação (Toshimori & Eddy, 2014). Os espermatozoides de equino são incomuns relativamente a outras espécies, pois em 40-60% das células, a ligação da cauda é abaxial, ou seja, a cauda não está ligada ao centro da base da cabeça, sendo a fossa de implantação acêntrica (Varner & Johnson, 2011), o que pode ser associado a motilidade circular e pode ser confundido com um desvio à normal motilidade progressiva.

A peça de ligação (pescoço ou colo) compreende o *capitulum*, colunas de fibras segmentadas e os centríolos proximal e distal. O *capitulum* articula com a cabeça a nível da fossa de implantação, fixando-se à placa basal. O conjunto de fibras segmentadas ancoram as fibras densas do flagelo, e os centríolos estão envolvidos no desenvolvimento da peça de conexão e axonema, como anteriormente referido (Varner & Johnson, 2011).

O flagelo contém um complexo central de microtúbulos que formam o axonema, uma disposição cilíndrica de nove pares de microtúbulos que rodeiam dois microtúbulos centrais. Este é circundado por fibras densas externas que se estendem do pescoço até a peça principal. A peça intermedia contém a bainha mitocondrial, uma hélice de mitocôndrias fortemente envolvida em torno das fibras densas externas e do axonema e que participam na produção e armazenamento de energia sob a forma de ATP. A maior parte do comprimento do flagelo é constituído pela peça principal, definida pela presença de uma bainha fibrosa envolvendo as fibras densas externas e o axonema. O segmento final contém apenas microtúbulos axonómicos (Toshimori & Eddy, 2014).

## 1.2. Técnicas de Colheita de Espermatozoides do Epidídimo de Equino

### 1.2.1. Colheita e armazenamento dos testículos e epidídimos

Os epidídimos podem ser obtidos a partir de testículos após castração eletiva ou após morte/eutanásia e castração imediata. Num estudo efetuado com pôneis está descrito que a anestesia geral com haloteno não interfere nos parâmetros de motilidade dos espermatozóides do epidídimo após colheita (Silva & Gadella, 2006), no entanto o mesmo não está estudado quanto à anestesia local, pelo que é recomendado que não seja injetado anestésico diretamente no epidídimo ou ducto deferente aquando se realiza a cirurgia. Não se sabe a influência dos fármacos utilizados para eutanásia na qualidade dos espermatozóides, pelo que se recomenda que a castração seja realizada antes da eutanásia (Schulman et al., 2003).

A castração deve ser sempre realizada de forma a não danificar o epidídimo e deve ser efetuada uma ligadura com fio de sutura no ducto deferente, o mais proximal possível, logo após remoção dos testículos (Bruemmer, 2006). Estes podem ser processados imediatamente ou armazenados a 5°C, de forma a serem enviados para um local onde seja feita a recolha dos espermatozóides.

Espermatozóides do epidídimo recolhidos de testículos de garanhão, armazenados a 5°C, retiveram a motilidade e a integridade da membrana até 96 h *post-mortem*, no entanto a motilidade progressiva decresceu significativamente entre as 48h e as 72h (Bruemmer, 2006). Em espermatozóides recolhidos da cauda do epidídimo, em testículos refrigerados, 24h (James et al., 2002) ou até 30h (Bruemmer, Reger, Zibinski, & Squires, 2002) após orquiectomia e criopreservados também não foram observadas diferenças significativas de qualidade comparativamente ao que foi imediatamente processado pós-cirurgia. Monteiro et al. (2013) verificou que não houve diferenças significativas na qualidade dos espermatozóides criopreservados do epidídimo entre: aqueles recolhidos imediatamente após orquiectomia, mantidos no epidídimo refrigerado até 24h; ou imediatamente recolhidos após orquiectomia, mas mantido refrigerado (a 5°C) até 24h antes de ser criopreservados.

Em estudos que avaliam a fertilidade de espermatozóides epididimários criopreservados, os resultados indicam que estas foram semelhantes entre os grupos inseminados com espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo imediatamente após a orquiectomia ou após 24h (Monteiro et al., 2011) ou até 48h (Monteiro et al., 2011) de armazenamento a 5°C na cauda do epidídimo. Inclusivamente, Vieira et al. (2013) demonstrou que a criopreservação espermatozóides epididimários de equino, armazenado até 96 h no epidídimo a 4 °C após castração, mantêm tanto a viabilidade quanto a capacidade de fertilizar *in vitro*.

Embora várias publicações relatem a relativa flexibilidade de tempo no processamento dos testículos, está descrito por norma o limite das 24h (Stawicki, McDonnell, Giguère, & Turner, 2015); é, no entanto, da maior importância conservar os testículos refrigerados a 5°C após

castração, pois em estudos em que estes foram armazenados à temperatura ambiente observou-se uma notável diminuição da qualidade dos espermatozóides (Bruemmer, 2006).

#### 1.2.2. Colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo

Estão descritas duas técnicas principais de colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo em equinos: a técnica de flutuação (*'floating'*) e a técnica de lavagem (*'flushing'*) retrógrada. Ambas são realizadas após epididimectomia a partir dos testículos que chegam ao laboratório.

A técnica de flutuação consiste em isolar a cauda do epidídimo e o ducto deferente e, com uma lâmina de bisturi, realizar incisões horizontais ao longo dessas estruturas (Bruemmer, 2006). São, depois, depositados numa placa de *petri* ou tubo de *falcon* com aproximadamente 5 ml de meio diluidor de sémen à base de leite, que é agitado e incubado a cerca de 10 min à temperatura ambiente (Monteiro et al., 2011). Os espermatozóides irão migrar para o meio, que é depois filtrado e processado.

Na técnica de *flushing* retrógrado, uma agulha é introduzida no ducto deferente, à qual é acoplada uma seringa contendo um meio diluidor para sémen. Os espermatozóides são transportados pelo meio de lavagem até serem expelidos na junção entre a cauda e corpo do epidídimo, onde o ducto epididimário foi seccionado (Garde et al., 1994). Granemann et al. (2006) descreveu uma modificação desta técnica, em que é realizada uma dissecação minuciosa da cauda do epidídimo de forma a retirar as fáscias de tecido conjuntivo que envolvem o ducto epididimário, com o objetivo deste ficar o mais linear possível, seguido de uma divisão em três segmentos, de forma a facilitar a lavagem. Os segmentos são, então, colocados na vertical e o ducto deferente é cateterizado com uma agulha de 14 a 18G, à qual é acoplada uma seringa contendo meio de lavagem, e é realizado o *flushing* (lavagem) do ducto deferente e cauda do epidídimo (Bruemmer, 2006; Granemann et al., 2006; Muradás et al., 2006). Os espermatozoides são recolhidos num tubo de *falcon* ou placa de *petri*. Habitualmente o meio de lavagem utilizado é um diluidor de sémen à base de leite desnatado mas também está descrito o *flushing* com ar e com solução salina tamponada (Guimarães et al., 2012; Heise, Kähn, Volkmann, Thompson, & Gerber, 2010; Roels et al., 2013).

Devido às incisões repetidas a técnica de flutuação está sujeita a uma maior contaminação sanguínea, sem, no entanto, provocar alterações nos parâmetros de qualidade do sémen (Cary et al., 2004). Inclusivamente, Cary et al. (2004) não obteve diferença significativa na motilidade pós-descongelamento entre os dois métodos de recuperação, nem na quantidade de espermatozóides obtidos com as duas técnicas distintas, obtendo 4485 e 4886 milhões de espermatozóides por testículo, para a técnica de *flushing* e *floating*, respetivamente. James et al. (2002) obteve, com a técnica de flutuação, um mínimo de 2667 e um máximo

de 6141 milhões de espermatozóides por testículo. Outros estudos apontam para valores superiores, de  $58,72 \times 10^9$  e  $25 \times 10^9$  espermatozóides recuperados por *flushing* retrógrado, por cavalo (Granemann et al., 2006 e Monteiro et al., 2011, respectivamente). Segundo Bruemmer (2006), entre 5 a 25 doses reprodutivas, consistindo de  $800 \times 10^6$  espermatozóides por dose, são tipicamente obtidas de um determinado garanhão. Embora esteja descrito que *“espermatozóides armazenados na cauda do epidídimo podem ser suficientes para até 10 ejaculações sucessivas dependendo da idade, tamanho e atividade reprodutiva do animal”* (citado de Muradás et al. (2006)), Granemann et al. (2006) obteve um número total de espermatozóides recuperados da cauda dos epidídimos esquerdo e direito em média 3,08 vezes superior ao número total médio de espermatozóides colhidos com a vagina artificial, valor semelhante ao obtido por Monteiro et al. (2011), de 3,2 vezes superior.

### 1.3. Criopreservação de Espermatozóides do Epidídimo de Equino

O processo de criopreservação espermática possibilita a utilização de sémen por um período indeterminado e permite a rápida difusão de material genético entre locais distantes, sendo de inegável importância para a reprodução animal. No entanto, impõe aos espermatozóides condições extremamente desfavoráveis à manutenção de sua viabilidade e função.

A criopreservação expõe as células a um *stress* térmico, induzido por baixas temperaturas, e a desequilíbrios osmóticos, levando à desidratação celular; e pode originar mudanças conformacionais irreversíveis nas células. O *stress* osmótico resulta na desidratação da célula, particularmente a taxas de arrefecimento muito lentas, devido à formação de gelo extracelular, que aumenta a concentração de soluto da fração não congelada e causa o transporte de água para fora da célula pelo gradiente osmótico (Sieme, Oldenhof, & Wolkers, 2016). Por outro lado, a taxas de arrefecimento elevadas, a célula não consegue perder água e forma cristais de gelo intracelulares (Sieme et al., 2016). Adicionalmente, a criopreservação de células espermáticas resulta na acumulação de espécies reativas ao oxigênio (*Reactive Oxygen Species* (ROS)), prejudiciais devido à peroxidação da membrana plasmática (Oldenhof et al., 2013).

A membrana plasmática do espermatozóide, assim como a de todas as células somáticas, é constituída por uma bicamada fosfolipídica. Em condições fisiológicas normais, a membrana está numa fase fluida, exibindo grande desordem conformacional, mas abaixo da temperatura de transição de fase, os fosfolípidos sofrem uma transição de um estado líquido para um estado de gel (Sieme, Oldenhof, & Wolkers, 2015). A capacidade das células de alterar de volume em resposta ao *stress* osmótico depende da permeabilidade da membrana plasmática, que resulta da sua composição fosfolipídica, presença de canais

iônicos, proteínas e outras estruturas, e pode ser alterada por agentes crioprotetores (Sieme et al., 2016).

Agentes crioprotetores penetrantes entram na célula devido à permeabilidade da membrana plasmática, difundindo-se através da mesma para o citoplasma. Exemplos destes são o glicerol (GLY), etilenoglicol (EG), e dimetilformamida (DMF), que atuam ao estabilizar a membrana plasmática das células espermáticas e modulam a taxa de desidratação e de formação de gelo intracelular. Assim, os crioprotetores penetrantes diminuem as lesões induzidas por arrefecimento lento, mas oferecem pouca proteção para o arrefecimento rápido (Sieme et al., 2016).

Os crioprotetores não penetrantes, di e polissacarídeos, atuam no espaço extracelular, diminuindo a formação de cristais de gelo (efeito solvente) permitindo a desidratação celular antes que ocorram danos por hiperosmolaridade (Oldenhof et al., 2013).

Combinações de crioprotetores com diferentes funções de proteção podem favorecer a taxa de sobrevivência dos espermatozóides (Oldenhof et al., 2013). Para além dos crioprotetores referidos, os diluidores de congelação de sémen habitualmente são constituídos por leite desnatado, gema de ovo, açúcares e outros constituintes, como antibióticos.

#### *1.3.1. Crioprotetores penetrantes de membrana*

O glicerol (GLY) foi o primeiro crioprotetor e o mais utilizado para congelar sémen de diferentes animais, incluindo equinos. No entanto, estudos têm demonstrado que este pode danificar os espermatozóides durante a criopreservação, atingindo menor motilidade após descongelar (Cary et al., 2004), particularmente em alguns garanhões com má congelabilidade, os designados '*bad freezers*'. A sua toxicidade deve-se em parte ao *stress* osmótico a que sujeita a célula espermática, pois este composto tem uma capacidade de penetração ao nível da membrana celular inferior à de outros crioprotetores (Morillo Rodriguez et al., 2012). A permeabilidade da membrana plasmática dos espermatozóides do garanhão a GLY, EG e DMF a 22°C foi previamente determinada como sendo 0,38, 0,73 e 0,69 x10<sup>3</sup> cm/min, respetivamente (Oldenhof et al., 2017). Outros efeitos do glicerol provêm da sua toxicidade química a nível celular (Oldenhof et al., 2017). Foi, então, sugerido que o composto ideal seria de baixo peso molecular, grande solubilidade e mínima toxicidade.

Outros crioprotetores penetrantes de membrana foram alvo de estudo para a criopreservação de sémen equino, entre eles o etilenoglicol (EG), a dimetilformamida (DMF), a metilformamida (MF), a acetilamida. As amidas têm um peso molecular inferior ao do glicerol, provocando menos *stress* osmótico na membrana celular dos espermatozóides (Alvarenga, Papa, Landim-Alvarenga, & Medeiros, 2005; Oldenhof et al., 2017). Assim, este grupo de compostos tem sido alvo de diversos estudos e atinge, hoje, bons resultados na criopreservação de sémen de equino. Vários autores relataram que a DMF têm um potencial

de crioproteção semelhante ou até melhor (Alvarenga et al., 2005; Oldenhof et al., 2017; Squires, Keith, & Graham, 2004; Vidament et al., 2002) que o glicerol, em sémen de equino. Para além do agente protetor de membrana, interessa estudar tempos e protocolos de refrigeração. Oldenhof et al. (2017) refere que, para a DMF, a taxa de arrefecimento torna-se menos crítica, enquanto para o GLY, e particularmente para o EG, taxas de arrefecimento mais altas são necessárias. Para além da taxa de arrefecimento, existe também um valor de concentração ideal para cada crioprotetor. No mesmo estudo, obteve-se os valores de concentração ótimos de 2,5% a 5% para GLY e EG. Vidament et al. (2002) observou que a DMF a 2% proporcionou maior motilidade pós-descongelamento do que a 1%, 3% e 5%; em contraste, Squires et al. (2004) comparou MF e DMF a 0,55, 0,6 e 0,9M e relatou que concentrações mais elevadas (0,6 e 0,9 M) resultaram em maior motilidade. Diversas publicações discutem o melhor composto para criopreservar espermatozóides epididimários de equino. Papa et al. (2008) compararam a utilização de Botucurio®, à base de gema de ovo, glicerol e dimetilformamida; EDTA-lactose; e INRA 82, com 5% de glicerol. Obtiveram uma motilidade pós-descongelação bastante superior com o Botucurio®, seguida do EDTA-Lactose e depois INRA 82. No entanto, a integridade de membrana apresentou-se semelhante entre os grupos. Olaciregui et al. (2014) comparou a substituição do glicerol por dimetilformamida e a substituição de gema de ovo fresca por gema de ovo pasteurizada. Após descongelação, os espermatozóides congelados exclusivamente com DMF apresentou melhor motilidade embora duas horas pós-descongelação os que foram congelados com DMF + GLY apresentaram motilidade superior aos restantes grupos. A utilização de gema de ovo fresca obteve resultados superiores em relação à gema de ovo pasteurizada. Álvarez et al. (2014) comprova estes resultados demonstrando que a criopreservação de espermatozóides do epidídimo com INRA 96® a que foi adicionada DMF, a uma concentração de 5% ou em conjunto com glicerol (DMF 2,5% + glicerol 2,5%), apresentou melhores resultados globais (motilidade progressiva, integridade de membrana (HOST) e viabilidade).

### *1.3.2. Adição de plasma seminal aos espermatozóides epididimários*

O plasma seminal desempenha um papel ativo no transporte e na sobrevivência de espermatozóides viáveis no trato reprodutivo feminino e na eliminação de espermatozóides não viáveis do útero (Troedsson et al., 2005). Os espermatozóides recolhidos da cauda do epidídimo nunca contactaram com plasma seminal, ao contrário dos espermatozóides presentes num ejaculado. Assim, com este método de colheita consegue-se estudar a importância do plasma seminal na qualidade do sémen, sendo que os resultados são bastante controversos. Inclusivamente, no ejaculado, Troedsson et al. (2005) descrevem como deletério o plasma seminal adicionado ao sémen antes de congelação.

Stout (2000) testou a adição de plasma seminal ao realizar o *flushing* da cauda do epidídimo, diluído de 1:1 no diluidor de leite habitualmente utilizado, obtendo um aumento da motilidade total dos espermatozóides significativo antes de congelar, mantendo-se, embora menos significativamente, após congelação; outros estudos em que o plasma seminal foi adicionado antes da criopreservação revelou que este não teve efeitos significativos na motilidade pós-descongelação (Bruemmer et al., 2002; Cary et al., 2004; Tiplady, Morris, & Allen, 2002). Heise et al (2010) concluiu que as taxas de gestação obtidas com espermatozóides epididimários, frescos e congelados, sujeito ao *flushing* com plasma seminal, foram superiores às taxas obtidas com espermatozóides da mesma origem não sujeitos ao mesmo tratamento, ao contrário do relatado noutro estudo semelhante, em que não foram observadas diferenças significativas (Morris, Tiplady, & Allen, 2002).

### 1.3.3. *Fertilidade com espermatozóides da cauda do epidídimo de equino criopreservados*

Existem poucos estudos que abordam a fertilidade dos espermatozóides do epidídimo de equino, embora a primeira gestação de égua com sémen criopreservado tenha sido com espermatozóides epididimários (Barker & Gandier, 1957). Neste primeiro relato do tema, apenas uma égua em sete (14%) concebeu um poldro mas provou-se que a colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo associada à sua criopreservação é uma técnica viável e que muito poderia acrescentar ao universo da reprodução assistida em equinos.

Morris et al. (2002) obteve uma taxa de gestação de 45% (9/20) ao utilizar uma dose de  $200 \times 10^6$  espermatozóides do epidídimo frescos, depositados na ponta do corno uterino por histeroscopia. Este número foi bastante inferior ao utilizar a mesma dose de espermatozóides do epidídimo criopreservados, tanto para inseminação convencional no corpo uterino (1/13, 8%) como por histeroscopia (9/51, 18%), mas provou que é possível obter uma gestação mesmo com doses mais baixas. Ao utilizar uma dose de  $400 \times 10^6$  espermatozóides epididimários criopreservados com Botucio, Melo et al. (2008) obteve uma taxa de gestação de 69,23% (9/13) e Papa et al. (2008) obteve confirmação da gestação 15 dias pós-ovulação em 12 de 18 éguas inseminadas (66,6%).

Monteiro et al. (2011) demonstrou que espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo e criopreservados, imediatamente após a castração ou após 24 h de refrigeração do epidídimo, têm a mesma fertilidade que o espermatozóide ejaculado, obtendo uma taxa de gestação de 61,5% (8/13) para sémen ejaculado, 92,3% (12/13) para espermatozóides do epidídimo recolhidos imediatamente após castração, e 61,5% (8/13) para espermatozóides recolhidos 24h após castração. Mais recentemente, Stawicki et al. (2015) avaliou a fertilidade destas células após criopreservação, tendo sido recolhidas 24 e 48h após castração e armazenamento dos testículos a 5°C . Obteve gestação em 7 de 13 éguas



(53,8%) para os espermatozóides processado às 24h, e em 4 de 10 (40%) para os que foram processados às 48h, confirmando que é possível manter a viabilidade e fertilidade espermática em testículos refrigerados após castração. Guasti et al. (2017) obteve uma taxa de gestação de 11/16 (68,7%) ao utilizar espermatozóides do epidídimo criopreservados com uma dose de  $800 \times 10^6$  espermatozóides, e de 5/16 (31,5%) com uma dose de  $100 \times 10^6$  espermatozóides.

Em estudos que utilizaram a técnica de injeção intra-citoplasmática (ICSI) com espermatozóides epididimários de equino, foi novamente comprovada a capacidade fértil destas células (Herrera, Miragaya, Conde, & Hynes, 2006; Rosati et al., 2004). Inclusivamente, Herrera et al. (2006) afirmou que espermatozóides epididimários criopreservados podem ser utilizados para ICSI e os resultados obtidos com este tipo de células não diferem daqueles observados com espermatozóides ejaculados refrigerados ou congelados. No mesmo estudo, os espermatozóides epididimários criopreservados com glicerol ou dimetilformamida também obtiveram resultados de fertilidade semelhantes entre si.

#### 1.4. Análise de Sémen

##### 1.4.1. Motilidade

A análise da motilidade dos espermatozóides é facilmente identificável e reflete vários aspectos essenciais do seu metabolismo, sendo um dos parâmetros utilizados por rotina numa primeira avaliação de qualquer amostra de sémen. A estimativa subjetiva da motilidade dos espermatozóides inclui motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e vigor (numa escala subjetiva de 1 a 3 ou 1 a 5); e é obtida por observação direta ao microscópio ótico de uma gota de sémen, idealmente diluída entre 25 e 50 milhões de espermatozóides / ml, sob placa aquecida a 37°C (Morris et al., 2002).

Na tentativa de eliminar variações nas estimativas de motilidade que podem surgir com a avaliação subjetiva da motilidade dos espermatozóides, técnicas computadorizadas objetivas foram desenvolvidas: *Computer-assisted sperm analysis* (CASA) é um sistema que analisa automaticamente os movimentos de um grande número de espermatozóides e determina vários parâmetros cinéticos, como a percentagem total de espermatozóides móveis (MT), percentagem de espermatozóides com movimentos progressivos (MP), amplitude de deslocamento da cabeça (ALH), velocidade média do trajeto (VAP) e velocidade curvilínea (VCL), entre outros. No entanto, estudos indicam que a forma de avaliar subjetivamente a motilidade total ou progressiva usando um microscópio ótico produz resultados semelhantes aos dos analisadores automáticos (Palmer & Magistrini, 1992; Samper, Hellander, & Crabo,

1991), e que, no caso de análises a sémen congelado, o meio crioprotetor pode interferir na análise automática (Palmer & Magistrini, 1992; Samper, Hellander, & Crabo, 1991).

No equino, a percentagem de espermatozóides progressivamente móveis pós-descongelção é considerada um mau preditor de taxas de gestação em éguas (Katila, 2001; Palmer & Magistrini, 1992).

#### *1.4.2. Testes de Função e Integridade de Membrana Plasmática*

##### *1.4.2.1. Teste de Coloração Vital com Sondas Fluorescentes*

Protocolos de coloração foram desenvolvidos para detetar a integridade das membranas e organelos de espermatozóides de mamíferos. A integridade estrutural da membrana plasmática pode ser considerada um indicador indireto da viabilidade espermática (Blach, Amann, Bowen, & Frantz, 1989). O funcionamento das colorações vitais assenta no princípio de que a integridade da membrana plasmática é demonstrada pela capacidade de uma célula viável excluir o corante, enquanto que o corante difundirá passivamente em espermatozóides com membranas plasmáticas danificadas (Magistrini et al., 1997).

Um conjunto de sondas fluorescentes não penetrantes da membrana e com afinidade para o ADN é atualmente usado para este propósito, corando espermatozóides danificados: YoPro-1; Iodeto de Propídio (PI); Etídio Homodimérico-1 (EH), Brometo de Etídio (EB), ToPro-3 (Monómero de Iodeto de Benzotiazólio-4-quinolínio) e TOTO (dímero de cianina) (Colenbrander, Fazeli, van Buiten, Parlevliet, & Gadella, 1992). São, também, utilizados corantes de membrana acilada, que, devido às suas porções acetílicas, são anfipáticos e, portanto, podem passar a membrana intacta e entrar no espermatozóide viável (Silva & Gadella, 2006). Após entrada na célula são imediatamente desacilados por esterases intracelulares deixando a membrana da sonda impermeável e ficando o corante aprisionado no interior da célula, em caso de células integras, ou saindo da mesma, no caso de células não viáveis (Silva & Gadella, 2006). Exemplos destes corantes utilizados em análise de sémen são: CFDA (Diacetato de carboxifluoresceína), Calceína (CAM), SYTO-1 (Silva & Gadella, 2006) e SYBR-14 (Farah, Cuiling, Jiaojiao, & Huiping, 2013), que podem ser utilizados em conjunto com os referidos anteriormente de forma a corar os espermatozóides viáveis e não viáveis simultaneamente.

Após corar, as células são contadas ao microscópio, sob fluorescência. Podem ser avaliadas por citometria de fluxo para maior rapidez na análise, embora seja ainda um método dispendioso, reservado para trabalhos de investigação (Garner & Johnson, 1995; Silva & Gadella, 2006).

A dupla coloração SYBR-14 / PI tem sido usada para avaliar a qualidade do sêmen de garanhão após congelação/descongelação. Os espermatozóides considerados viáveis emitem fluorescência verde (SYBR-14 +), e os inviáveis emitem cor vermelha (PI +). Verificou-se uma correlação negativa ( $r = -0,49$ ) entre a percentagem de espermatozóides que se movem rapidamente e a percentagem de espermatozóides emitindo fluorescência vermelha (PI +). Em contraste, uma correlação positiva ( $r = 0,35$ ) foi encontrada entre a percentagem de espermatozóides rápidos e aqueles que emitiam fluorescência verde (Gillan, Evans, & Maxwell, 2005; Katila, 2001). Noutro estudo, a avaliação da viabilidade de espermatozóides congelados e descongelados, corados com PI, analisados por citometria de fluxo, correlacionou-se com a fertilidade ( $r = 0,68$ ), sendo melhor que outros métodos (motilidade, penetração de oócitos de hamsters) (Magistrini et al., 1997).

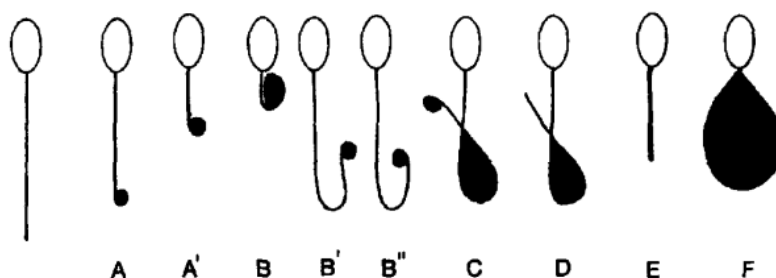
#### 1.4.2.2. Teste Hipo-osmótico

O teste hipo-osmótico (HOST – *hypo-osmotic swelling test*) é utilizado para avaliar a função da membrana plasmática de espermatozóides humanos (World Health Organization., 2010), tendo sido adaptado para possibilitar a análise de espermatozóides equinos (Neild et al., 1999; Nie & Wenzel, 2001). É assente no pressuposto de que ao suspender células espermáticas numa solução hipo-osmótica a água irá entrar para a célula, na tentativa de restabelecer o equilíbrio osmótico. Assim, o volume da célula aumenta, particularmente a nível do flagelo do espermatozóide (Katila, 2001; Nie & Wenzel, 2001), o que altera a sua forma, adotando uma forma enrolada. O aparecimento de caudas enroladas, evidenciadas na Figura 3, é um sinal de que a água foi transportada de forma fisiológica para o interior da célula de forma a atingir o equilíbrio osmótico, o que indica uma membrana flagelar intacta e funcional (Drevius & Eriksson, 1966). No entanto, (Colenbrander et al., 1992) verificou que a resposta positiva ao teste é maior em sêmen fresco do que em sêmen após descongelação, sugerindo que o processo de congelação/descongelação pode alterar componentes da membrana que participam no transporte de iões e metabolitos.

A solução hipo-osmótica ideal para realizar este teste em sêmen equino tem sido alvo de estudo, dado que se considera este teste um bom indicador da integridade funcional da membrana plasmática do espermatozóide e simples de integrar na análise de sêmen de rotina (Katila, 2001). (Katila, 2001) demonstraram que uma solução de sacarose a 100mOsm foi a que apresentou mais resultados positivos (HOST+), sendo que diferenças de temperatura e tempo de incubação não alteraram os resultados. Neild et al. (1999) constatou que o número máximo de espermatozóides equinos turgidos foram observados com soluções de frutose, sacarose e lactose, cada uma a 100, 50 e 25 mOsm, sendo que não verificou diferenças nos resultados quer entre estes açúcares, quer entre estes valores

de osmolaridade. Kuisma et al. (2006) utilizou uma solução de frutose, citrato de sódio e água destilada com osmolaridade de 150mOsm e Katila (2001) uma solução de 100mOsm.

Figura 3 - Alterações morfológicas típicas de turgescência, observadas em sémen de equino após congelamento/ descongelamento. Imagem retirada de Neild et al. (1999).



Legenda: à esquerda um espermatozoide normal e de A-F, espermatozoides positivos ao HOST (HOST(+)), apresentando alterações típicas de “cauda enrolada”.

A relação da fertilidade do sémen com o resultado do teste hipo-osmótico é difícil de avaliar. Neild et al. (2000) não encontrou correlação entre este resultado e a percentagem de éguas gestantes, mas mostrou uma tendência de correlação com o número de inseminações por gestação. Noutro estudo, o HOST imediatamente após o descongelamento mostrou uma correlação negativa com a taxa de parto (Kuisma et al., 2006). Já Katila (2001) verificou uma correlação significativa mas fraca entre a taxa de parto e o HOST realizado em sémen imediatamente após o descongelamento ou após incubação de 3 h a 37 ° C.

## 2. Trabalho Experimental

### 2.1. Objetivos

Este trabalho teve como objetivos: 1) Verificar a eficácia da técnica de *flushing* retrógrado na colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo, em testículos refrigerados a 5°C 24h após orquiectomia; 2) correlacionar o volume de epidídimo dissecado e sujeito a lavagem com o número de espermatozóides obtidos dessa porção; 3) comparar dois diluidores para criopreservação de espermatozóides da cauda do epidídimo; 4) comparar motilidade e número de espermatozóides obtidos por colheita de ejaculado com vagina artificial e por recuperação da cauda do epidídimo.

### 2.2. Materiais e métodos

#### 2.2.1. *Desenho experimental*

Foi feita a recolha de espermatozóides da cauda do epidídimo de vinte e quatro testículos, de doze cavalos, sendo dez de raça Puro Sangue Lusitano (PSL), um Hannoveriano e um Pônei da Terceira; com idades compreendidas entre os três anos e meio e os dez anos, em alturas distintas do ano.

Após recuperação os espermatozóides, estes foram criopreservados utilizando dois crioprotectores distintos (metodologia de criopreservação descrita abaixo): o Botucrio®, da marca BotuPharma®, à base de gema de ovo, glicerol e dimetilformamida (grupo Bc); e uma mistura do meio Gent (marca Minitube®), contendo gema de ovo e 5% de glicerol, com diluidor à base de leite desnatado na proporção 1:1, de forma a reduzir a quantidade de glicerol inicial para 2,5% (Grupo Gd). Por fim, comparou-se o sémen criopreservado obtido por colheita com vagina artificial (VA) com os espermatozóides criopreservados obtidos da cauda do epidídimo após castração, em cinco cavalos, quatro de raça PSL e um pônei da Terceira, com idades compreendidas entre os 7 anos e os 17 anos.

#### 2.2.2. *Orquiectomia e armazenamento dos testículos*

Os cavalos foram submetidos a orquiectomia por técnica aberta por três médicos veterinários distintos com o cuidado de laquear o ducto deferente imediatamente após remoção do testículo (figura 4). Os testículos, após remoção, foram acondicionados numa caixa refrigeradora a <5°C e enviados para o laboratório no mesmo dia. O processamento dos testículos e colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo foi realizado em todos os casos nas primeiras 24h após castração/refrigeração.

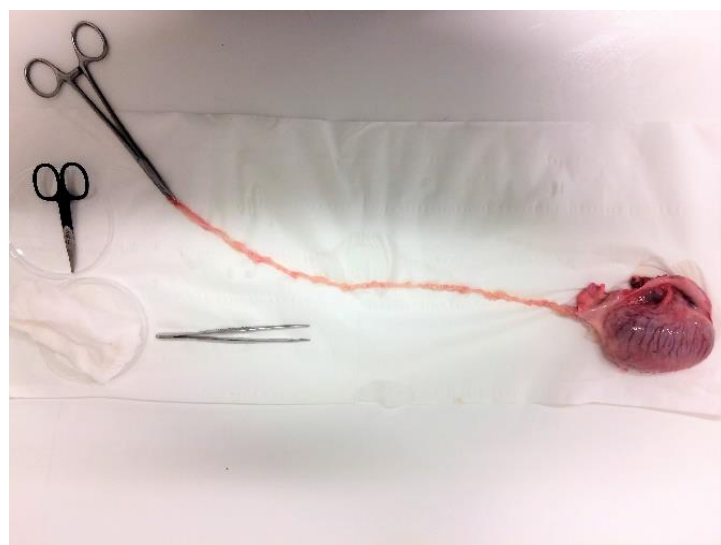
### 2.2.3. Colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo

Os testículos de cada cavalo foram lavados e pesados individualmente. As células espermáticas foram recolhidas pela técnica de *flushing* retrógrado, conforme descrito por Bruemmer (2006): Os epidídimos foram dissecados, eliminando o tecido conjuntivo responsável pelo enovelamento do ducto epididimário, de forma a este adquirir uma forma o mais linear possível, conforme se observa na figura 5, e oferecer o mínimo de resistência à passagem do meio (Bruemmer, 2006).

Figura 4 – Testículo antes do processamento, com uma pinça hemostática a laquear o ducto deferente.



Figura 5 – Testículo após dissecção do ducto epididimário, que se encontra estendido e laqueado por uma pinça.



Após dissecação minuciosa, o ducto epididimário foi seccionado na sua zona mais proximal já que este adquire um diâmetro muito diminuído no fim da zona da cauda do epidídimo. Introduziu-se uma agulha de 18 G no lúmen do ducto deferente, com a ajuda de uma pinça hemostática que, ao pressionar o ducto e a agulha, impede que o meio faça refluxo. Acoplou-se à agulha uma seringa de 20 ml contendo um meio diluidor comercial à base de leite (EquiPlus, da marca Minitube®), e procedeu-se à lavagem (*flushing*) da porção de ducto dissecada, recolhendo as células espermáticas + diluidor num tubo de *falcon*, conforme observado nas figuras 6 e 7.

Após lavagem, a porção de epidídimo percorrida pelo meio foi introduzida num tubo graduado contendo água, e efetuou-se a medição do volume de epidídimo (Vepi) por imersão, em mililitros.

Figura 6 - Imagem do processo de *flushing* da porção dissecada da cauda do epidídimo.



Legenda: Na mão do operador encontra-se uma seringa com diluidor, acoplada a uma agulha inserida no lúmen do ducto epididimário, que se encontra na vertical. Um tubo de *falcon* encontra-se na outra extremidade, recolhendo os espermatozóides durante o flushing.

Figura 7 – Tubo de *falcon* contendo os espermatozóides e diluidor, após *flushing*.



Legenda: Verifica-se no fundo do tubo uma zona mais opaca que corresponde à fração celular.

Para cada epidídimo (n=24), obteve-se um tubo de *falcon* contendo uma solução de espermatozóides e meio diluidor. A quantidade de diluidor utilizado variou de acordo com a percepção do operador, de forma a utilizar-se o meio necessário para recolher todos os espermatozóides presentes na porção de ducto dissecada. Foi avaliada a concentração da solução existente em cada tudo, através de um hemocítmetro (câmara de Neubauer), e o seu volume, obtendo-se o número de espermatozóides recolhidos por cada epidídimo. Após obtenção da concentração e volume da solução (diluidor + espermatozóides) resultante da lavagem de cada epidídimo, o conteúdo de ambos os tubos contendo os espermatozóides dos dois epidídimos, foi homogeneizado em conjunto e logo dividido novamente por dois tubos, de forma a obter duas amostras idênticas para cada indivíduo.

#### 2.2.4. *Processamento e criopreservação dos espermatozóides do epidídimo*

A solução obtida foi centrifugada a 600x g durante 10 min, após os quais foi-lhe cuidadosamente retirado o sobrenadante. O *pellet* contendo os espermatozóides foi suspenso novamente num tubo com Botucríio® (Bc) e no outro com Gent diluído 1:1 com diluidor à base de leite desnatado (Gd), até uma concentração de 300 milhões de espermatozóides por mililitro. A motilidade total (MT) de cada grupo (Bc e Gd) foi avaliada nesta fase, antes de criopreservar, por observação direta ao microscópio. Após avaliação da

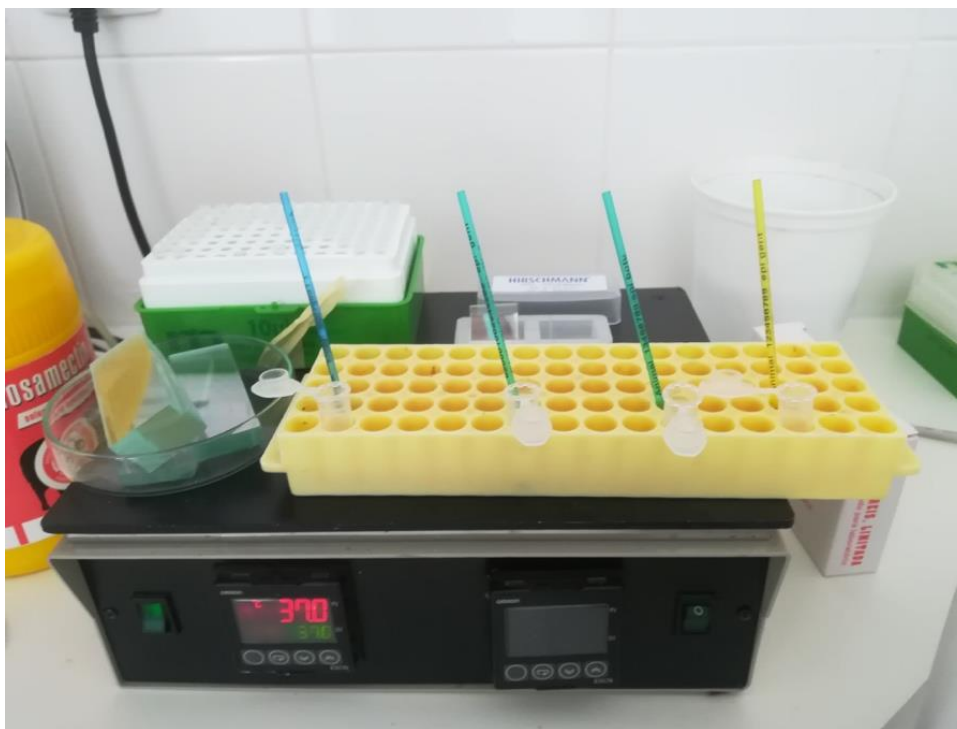


motilidade, procedeu-se ao enchimento manual de palhinhas de 0,5ml (Minitub® Ibérica, Spain) previamente identificadas. Após o enchimento e selagem, as palhinhas foram dispostas numa prateleira específica (*rack*) e congeladas manualmente. Primeiramente, as *racks* foram introduzidas no frigorífico, para possibilitar uma refrigeração lenta até aos 4 ° C. Este passo levou 60 minutos no grupo Gd e 25 min para o grupo Bc. Após os períodos de refrigeração, as *racks* foram colocadas 4 cm acima da superfície de azoto líquido por 15 min, ao nível dos vapores, e, posteriormente, mergulhadas no azoto líquido e logo armazenadas nos respetivos contentores, conforme descrito por Macedo et al. (2018).

#### 2.2.5. Descongelção e análise dos espermatozóides do epidídimo

Para proceder à análise dos espermatozóides, uma palhinha de cada grupo (Bc e Gd) para cada cavalo, foi descongelada em banho-maria a 37 ° C por 30 s e o seu conteúdo transferido para um tubo *ependorf* pré-aquecido a 37 ° C. O sémen descongelado foi diluído 1:2 com o mesmo diluidor que foi usado na sua criopreservação, pré-aquecido a 37 ° C, de forma a diminuir a concentração de células e possibilitar uma leitura mais correta ao microscópio. As amostras foram mantidas em placa aquecida até serem analisadas, conforme se observa na figura 8.

Figura 8 - Amostras de sémen após descongelação mantidas numa placa aquecida até análise.



#### 2.2.5.1. Motilidade

Os parâmetros de motilidade total (MT) e progressiva (MP) foram analisados da seguinte forma:

1. Foi colocada uma gota de 5  $\mu$ l da amostra de sémen entre lâmina e lamela num microscópio com placa aquecida a 37 ° C.
2. A avaliação foi realizada sob microscopia de contraste de fase positivo numa ampliação de 100x.
3. Os valores percentuais de motilidade total e progressiva foram obtidos através do sistema de análise computadorizada de sémen (CASA – *Computer-Assisted Sperm Analysis*) e através de observação direta ao microscópio.
4. Para cada amostra foi determinada a motilidade total, com base na análise de cerca de 2000 espermatozóides.

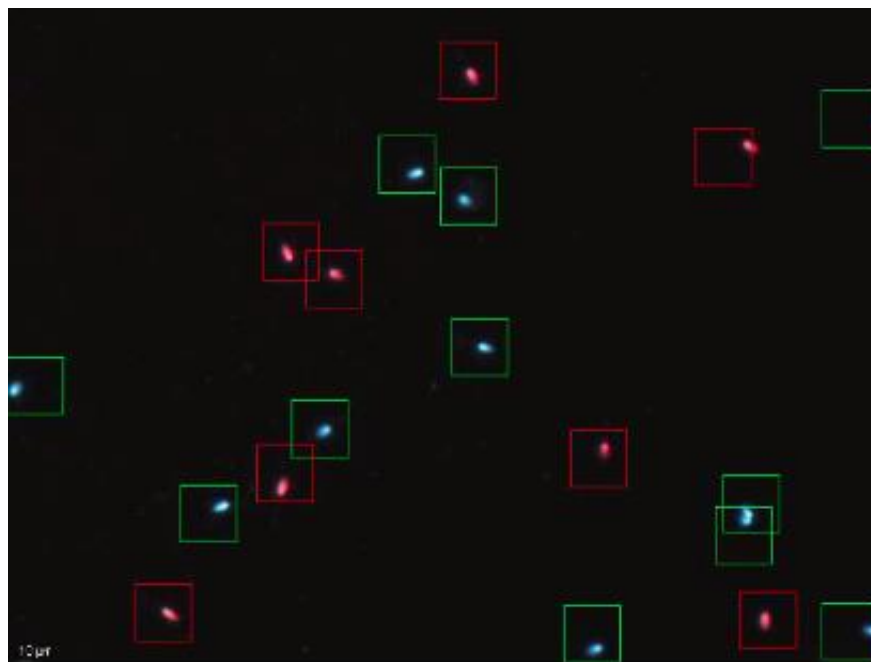
#### 2.2.5.2. Teste de coloração com sondas fluorescentes

Para proceder ao teste de viabilidade com sondas fluorescentes utilizou-se o kit comercial FluoVit (Microptic®, Barcelona, Espanha), segundo o seguinte protocolo:

1. Num tubo de *eppendorf* foi colocado 1  $\mu$ l da solução azul ao que se seguiu a sua incubação em estufa a 37°C durante 5 minutos;
2. De seguida foram colocados, no mesmo tubo, 10  $\mu$ l do sémen descongelado e procedeu-se à homogeneização da amostra com o corante com auxílio da ponta da micropipeta;
3. Foi depois acrescentada uma gota de 1  $\mu$ l da solução corante vermelha que se colocou na parede interior do mesmo tubo de *eppendorf* de forma a que esta não entrasse em contato com a solução anteriormente preparada;
4. O tubo, com a solução de corante azul e sémen e com a gota de corante vermelho na parede do mesmo, foi colocado novamente em estufa a 37°C, durante 5 minutos;
5. Após o tempo de incubação, o tubo foi gentilmente agitado de forma a homogeneizar a gota de corante vermelho com o resto da solução;
6. Por fim, foi retirada uma gota de 5  $\mu$ l da solução obtida que foi observada entre lâmina e lamela sob microscopia de fluorescência numa ampliação de 200x;
7. Procedeu-se à avaliação da viabilidade em cerca de 500 espermatozóides utilizando o sistema CASA;

8. Os espermatozóides corados de vermelho foram classificados como “não viáveis” (Fluo-), o que foi entendido como ausência de integridade da MP. Pelo contrário, os espermatozóides corados de azul foram classificados como “viáveis” (Fluo+), e foram associados a uma membrana plasmática íntegra. Um exemplo do campo microscópico observado após coloração pode ser observado na figura 9.

Figura 9 - Imagem de campo microscópico sob fluorescência, após coloração com Kit Fluovit, numa ampliação de 200x.



Legenda: Os espermatozóides nos quadrados verdes (emitem cor azul) são viáveis (Fluo+) e os espermatozóides nos quadrados vermelhos (emitem cor vermelha) são não viáveis (Fluo-).

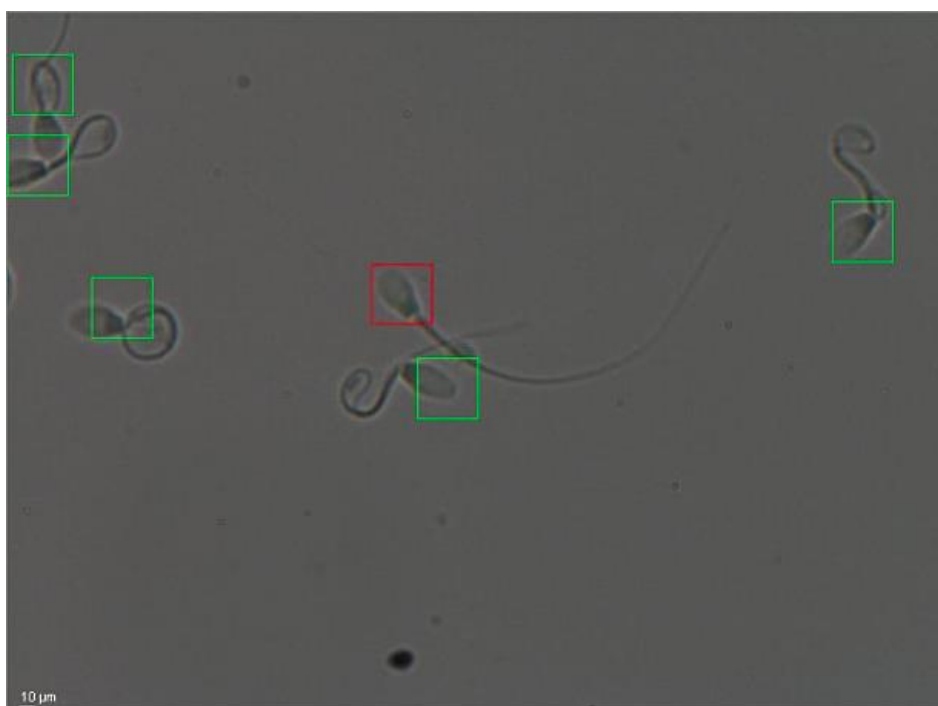
#### 2.2.5.3. Teste de turgescência hipo-osmótico (HOST)

Foi realizado o teste de turgescência hipo-osmótico (HOST), para avaliar a função da membrana plasmática. Utilizou-se uma solução hipo-ósmodica contendo 4,5g de frutose e 2,717g de citrato de sódio em 500 ml de água destilada, obtendo-se uma solução com osmolaridade de 106 mOsm (Katila, 2001), e foi efectuado o seguinte protocolo:

1. Colocou-se 0,5 ml da solução hipo-ósmodica num tubo de *eppendorf* e incubou-se em estufa, a 37°C, durante 5 minutos.
2. Adicionou-se 125µl da amostra de sémen ao tubo de *eppendorf* com a solução hipo-osmótica pré-aquecida, homogeneizou-se e incubou-se em estufa, a 37°C, durante 45 minutos.

3. Após o tempo de incubação, agitou-se a solução, e retirou-se uma gota de 5µl numa lâmina previamente aquecida em placa de aquecimento a 37°C.
4. Contabilizou-se um total de 200 espermatozóides, sob microscopia de campo claro, numa ampliação de 600x. Os espermatozóides que exibiam características específicas de turgescência (caudas enroladas), como os apresentados na figura 9, foram tidos como viáveis (HOST+) e os que não apresentavam as mesmas alterações em nenhum grau foram tidos como não viáveis (HOST-).

Figura 10 - Campo microscópico da avaliação do HOST, sob ampliação de 600x.



Legenda: Nos quadrados verdes encontram-se espermatozóides viáveis (HOST+) e nos quadrados vermelhos espermatozóides negativos ao HOST (HOST-).

#### *2.2.6. Análise do sémen obtido por colheita com vagina artificial*

Cinco ejaculados de cinco cavalos sujeitos a orquiectomia foram previamente recolhidos com vagina artificial e criopreservados de acordo com o protocolo referido anteriormente, com o diluidor Botucrio. Uma palheta de cada ejaculado foi descongelada em banho maria a 37°C e observada ao microscópio para obtenção da concentração, por contagem em hemocitómetro (câmara de Neubauer), e da motilidade total e progressiva, atribuídas por observação direta ao microscópio. Com estes dados, descartou-se os valores inferior e superior de motilidade total e progressiva, para cada garanhão, e obteve-se uma média da MT e MP com os valores dos restantes quatro ejaculados. Procedeu-se à comparação da motilidade total e progressiva após descongelação entre os espermatozóides recolhido da

cauda do epidídimo ou por colheita com vagina artificial (ejaculado). Também se comparou o número de espermatozóides obtidos com cada método de colheita.

#### 2.2.7. *Análise estatística*

A análise estatística foi efetuada com recurso ao programa informático *R*.

Todos os parâmetros determinados foram devidamente testados para a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Foram considerados os valores de média ( $\bar{x}$ )  $\pm$  desvio padrão ( $\sigma$ ) para os parâmetros com distribuição normal e valores de mediana ( $\tilde{x}$ )  $\pm$  intervalo interquartil (IQR) para os parâmetros que não seguiram uma distribuição normal.

Para analisar eventuais correlações entre parâmetros utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman ( $\rho$ ) e para avaliar diferenças entre médias para os mesmos parâmetros nos dois grupos (Bc e Gd) utilizou-se o teste t de Student emparelhado ou o teste de Wilcoxon, quando não se pôde assumir que a população é normalmente distribuída, neste caso apenas no parâmetro da MP do grupo Gd pós descongelação. Considerou-se um nível de significância de  $p < 0,05$ .

### 2.3. Resultados

#### 2.3.1. *Idade, parâmetros testiculares e número de espermatozóides recolhidos da cauda do epidídimo*

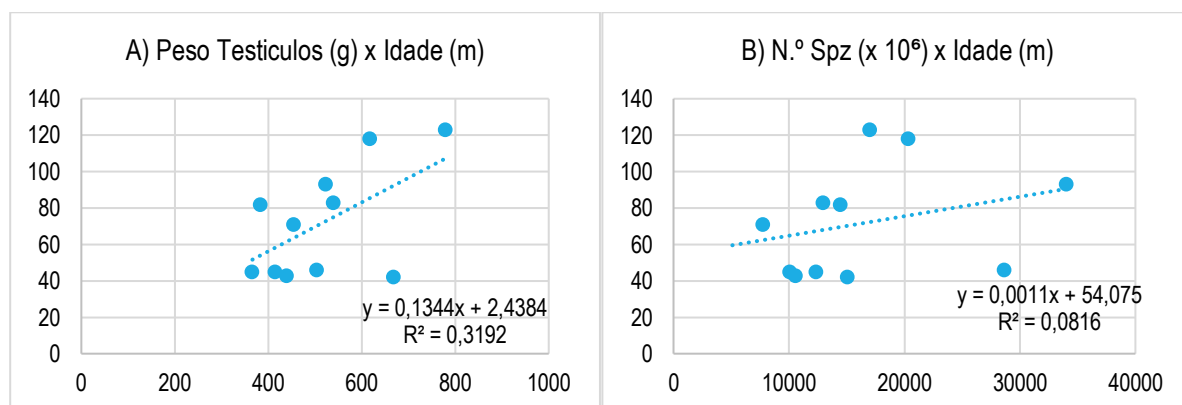
Conforme resumido na tabela 2, a média de idade da amostra é de 72 meses ( $\pm 9,2$ ), i.e. 6 anos, com um mínimo de 3,5 anos e um máximo de 10,2 anos. O peso médio do par testicular de cada indivíduo é de  $499 \pm 39,5$  g, sendo que o peso médio de cada testículo foi de  $250 \pm 14,1$  g. O volume médio da porção do epidídimo dissecada e sujeita a *flushing*, por cada testículo, foi de  $5 \pm 0,4$  ml. O número médio de espermatozóides obtido da cauda de cada epidídimo foi de  $7844 \pm 915$  milhões, e por cada cavalo (ambos os epidídimos) de  $15688 \pm 2432$  milhões.

Tabela 2 – Resultados obtidos de idade, peso dos testículos, volume de epidídimo e número de espermatozóides obtidos por recolha da cauda do epidídimo.

	Idade (meses)	PPar Testículos (g)	Testículo (g)	Epidídimo (ml)	Spz/par (x 10 <sup>6</sup> )	Spz/epi (x 10 <sup>6</sup> )
Media	72 ± 9,2	499 ± 39,5	250 ± 14,1	5 ± 0,4	15688 ± 2432	7844 ± 915
Min	42	303	149	2	5095	2280
Max	123	779	417	10	34018	18400

Legenda: idade do cavalo (Idade); peso, em gramas, de ambos os testículos (PPar Testículos) e de cada testículo (PTestículo); volume da porção dissecada de epidídimo sujeita a flushing por cada testículo (VEpidídimo); e número de espermatozóides, em milhões, recolhidos da cauda de ambos os epidídimos (Spz/par) e por cada epidídimo (Spz/epi).

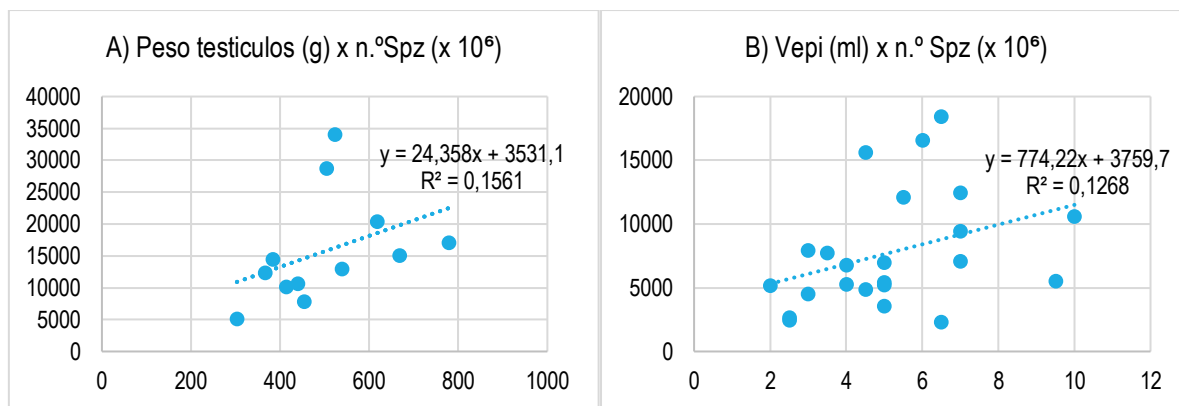
Figura 11 – A) Correlação entre o peso dos testículos e a idade em meses. B) Correlação entre o número de espermatozóides obtidos por indivíduo e a idade em meses.



A idade apresenta uma correlação de Spearman positiva tanto com o peso dos testículos,  $\rho(11) = 0,437$ ,  $p = 0,178$ ; como com o número de espermatozóides obtidos por cavalo,  $\rho(11) = 0,42$ ,  $p = 0,132$ . A figura 11 (A) representa os gráficos de dispersão que evidenciam tais relações.

O peso dos testículos apresenta uma correlação positiva com o número de espermatozóides recolhidos,  $\rho(12) = 0,643$ ,  $p = 0,027$ , que se encontra representada graficamente na figura 12 (A); e o volume da porção dissecada de epidídimo apresenta igualmente uma correlação com o número de espermatozóides recolhidos dessa mesma porção,  $\rho(23) = 0,643$ ,  $p = 0,02$ , também evidenciada na figura 12 (B).

Figura 12 – A) Correlação entre o peso do par de testículos e o número de espermatozóides obtidos. B) Correlação entre o volume da porção dissecada de epidídimo e o número de espermatozóides obtidos por epidídimo.



### 2.3.2. Parâmetros de avaliação nos espermatozóides epididimários

As células espermáticas de ambos os grupos, Bc e Gd, foram analisadas antes e após criopreservação para o parâmetro da motilidade total. Após descongelação avaliou-se a motilidade total e progressiva, e a integridade da membrana plasmática, pelo teste de coloração com sondas fluorescentes e pelo HOST. Os valores obtidos dos parâmetros avaliados encontram-se sumarizados na tabela 3.

Existe uma diferença significativa entre as médias dos grupos Bc e Gd, para todos os parâmetros analisados. Os resultados indicam uma MT antes de congelar significativamente superior no grupo Bc ( $64,2 \pm 3,5 \%$ ) do que no grupo Gd ( $35 \pm 6,7\%$ ),  $t(12) = 4,54$ ,  $p = 0,000$ . Da mesma forma, a MT após descongelar foi significativamente superior no grupo Bc ( $49,5 \pm 2,8 \%$ ), do que no grupo Gd ( $14,1 \pm 2,9 \%$ ),  $t(12) = 9,91$ ,  $p = 0,000$ . Relativamente à MP, o resultado foi semelhante, sendo significativamente superior no grupo Bc ( $26,4 \pm 10,4 \%$ )<sup>1</sup> do que no Gd ( $4,05 \pm 5,08 \%$ )<sup>1</sup>,  $Z = 0,00$ ,  $p = 0,000$ .

Os testes de viabilidade indicaram valores mais altos para o grupo Gd, de  $47,1 \pm 2,3 \%$  e  $65,5 \pm 2,0 \%$ , para os testes de fluorescência e HOST, respetivamente; enquanto que o grupo Bc apresentou valores de  $40,7 \pm 2,0 \%$  e  $50,6 \pm 1,5 \%$ . Após análise estatística, obteve-se diferenças significativas entre as médias dos dois grupos para ambos os testes: de fluorescência,  $t(12) = -2,95$ ,  $p = 0,013$ ; e HOST,  $t = -6,11$ ,  $p = 0,000$ .

<sup>1</sup> Os dados obtidos de MP no grupo Gd não assumem uma distribuição normal, pelo que os valores apresentados dessa variável assim como da MP para o grupo Bc são da mediana  $\pm$  intervalo inter-quartil, para possibilitar comparação.

Tabela 3 - Resumo dos valores obtidos dos parâmetros seminais analisados pré e pós-congelação para cada grupo: Botucurio® (Bc) e Ghent diluído (Gd).

	Pré-Congelação	Pós-Congelação				
	MT obs (%)	MT obs (%)	MT (%)	MP (%)	Fluo+ (%)	Host+ (%)
Bc	64,2 ± 3,5 <sup>a</sup>	47,1 ± 3,4 <sup>a</sup>	49,5 ± 2,8 <sup>a</sup>	26,8 ± 2,6 (26,4 ± 10,4 <sup>a</sup> ) <sup>2</sup>	40,7 ± 2,0 <sup>a</sup>	50,6 ± 1,5 <sup>a</sup>
Gd	35 ± 6,7 <sup>b</sup>	12,5 ± 2,3 <sup>b</sup>	14,1 ± 2,9 <sup>b</sup>	4,05 ± 5,08 <sup>b</sup> <sup>2</sup>	47,1 ± 2,3 <sup>b</sup>	65,5 ± 2,0 <sup>b</sup>

Legenda: motilidade total avaliada por observação ao microscópio (MT obs), motilidade total obtida pelo CASA (MT), motilidade progressiva obtida pelo CASA (MP), espermatozóides positivos ao teste de fluorescência (Fluo +) e espermatozóides positivos ao HOST (Host +). Diferenças significativas entre grupos estão assinaladas com letras diferentes dentro da mesma coluna.

### 2.3.3. Comparação entre espermatozóides do ejaculado e da cauda do epidídimo

Os resultados de motilidade total e progressiva do sémen ejaculado são comparados com os mesmos parâmetros em relação aos espermatozóides epididimários, após descongelação, em cinco cavalos. De igual modo, comparou-se o número de espermatozóides obtidos pelos dois métodos. Os valores estão descritos na tabela 4 e a figura 13 (A) apresenta uma comparação gráfica dos valores de motilidade total e progressiva e do número de espermatozóides obtido. Observa-se valores de MT e MP, para os dois métodos, aproximadamente idênticos em três (cavalo 3,4 e 5) dentro de cinco indivíduos e valores mínimos de 35% e 20%, para MT e MP, respetivamente. A quantidade de espermatozóides recolhidos da cauda do epidídimo foi de duas vezes (cavalo 1) a dez vezes (cavalo 3) superior à quantidade obtida no ejaculado, exceto para um dos indivíduos (cavalo 5), em que foi aproximadamente a mesma (figura 13 (B)). Ao aplicar um teste de hipóteses verificou-se que não há diferenças significativas entre a média da MT dos espermatozóides do epidídimo ou ejaculados,  $t(5)=1,32$ ,  $p=0,26$ ; nem entre a MP,  $Z(5)=2$ ,  $p=0,36$ .

<sup>2</sup> Valor apresentado corresponde à mediana ± intervalo inter-quartis, pois os dados não assumem normalidade.

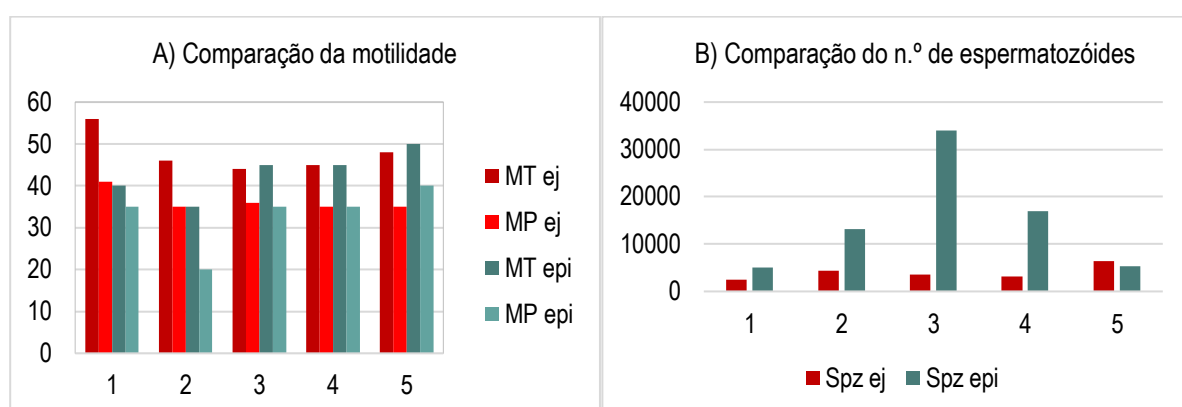


Tabela 4 - Valores pós-descongelamento de motilidade e número de espermatozóides obtidos por colheita da cauda do epidídimo e num ejaculado.

Cavalo		1	2	3	4	5	Média
Ejaculado	MT ej (%)	56	46	44	45	48	47,8 ± 23,2
	MP ej (%)	41	35	36	35	35	35,0 ± 1,0 <sup>3</sup>
	n.ºSpz (x 10 <sup>6</sup> )	2540	4337	3496	3157	6435	3993 ± 1511
Epidídimo	MT epi (%)	40	35	45	45	50	43,0 ± 32,5
	MP epi (%)	35	20	35	35	40	35,0 ± 0,0 <sup>3</sup>
	n.ºSpz (x 10 <sup>6</sup> )	5095	13100	34018	16986	5382	14916 ± 11830

Legenda: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e numero de espermatozóides (n.ºSpz) para o sémen obtido por ejaculado ou por colheita da cauda do epidídimo, para cinco cavalos (1 – 5).

Figura 13 – A) Comparação da motilidade total e progressiva para espermatozóides do ejaculado e da cauda do epidídimo. B) Comparação do número de espermatozóides obtidos pelos dois métodos de colheita.



Legenda: MT -motilidade total; MP – motilidade progressiva; colunas encarnadas para sémen ejaculado (ej); colunas verdes para espermatozóides epididimários (epi); em cinco cavalos (1-5).

<sup>3</sup> Valor apresentado corresponde à mediana ± intervalo inter-quartil, pois os dados não assumem normalidade.

## 2.4. Discussão

A amostra apresenta uma média de idades de 6 anos, com um mínimo de 3,5 anos e um máximo de 10,2 anos; pelo que se pode afirmar que todos os equinos utilizados atingiram a puberdade (Heninger, 2011). O peso testicular encontra-se semelhante aos valores reportados anteriormente por James *et al.* (2002),  $231 \pm 0,01$  g, mas superior ao reportado por Guimarães *et al.* (2012),  $169,9 \pm 10,58$  g, e Thompson e Johnson (1986),  $125,6 \pm 8,7$  g e  $177,3 \pm 10,4$  g, para os testículos esquerdo e direito, respetivamente. Da mesma forma, o peso médio do par testicular de cada indivíduo,  $499 \pm 39,5$  g, é superior ao valor obtido por Guimarães *et al.* (2012), de  $340,30 \pm 24,89$  g. A diferença observada pode ser devido à idade, raça ou época do ano. O garanhão é um reprodutor sazonal, com variação significativa do peso testicular entre época reprodutiva e não reprodutiva (Pickett, Voss, & Clay, 1998; Thompson & Johnson, 1986).

O número médio de espermatozóides obtido da cauda de cada epidídimo,  $7844 \pm 915$  milhões (tabela 2), encontra-se próximo dos valores reportados por Guimarães *et al.* (2012),  $7758 \pm 964,3$  e  $8873 \pm 1355$  milhões, para os epidídimos esquerdo e direito, respetivamente. James *et al.* (2002) obteve um valor médio ligeiramente inferior ( $5565 \pm 1008 \times 10^6$ ) e Monteiro *et al.* (2011) e Monteiro *et al.* (2013) um valor superior, de  $12,1 \pm 8,0 \times 10^9$  e  $16,2 \pm 7,79 \times 10^9$ , respetivamente. Da mesma forma, por cada cavalo (ambos os epidídimos), os valores obtidos neste trabalho ( $15688 \pm 2432 \times 10^6$ ) são semelhantes aos obtidos por Guimarães *et al.* (2012) ( $16550 \pm 2352 \times 10^6$ ) e inferiores aos de Monteiro *et al.* (2011) e de Granemann, *et al.* (2006),  $25,0 \pm 17,1 \times 10^9$  e  $58,72 \pm 34,23 \times 10^9$ , respetivamente. Estas diferenças podem ser devido à capacidade de produção espermática intrínseca de cada garanhão, raça ou época do ano no momento da castração; bem como dependem da experiência de cada operador na realização da técnica de colheita. No entanto, de todos os cavalos foram recolhidos entre os 4 e 20 biliões de espermatozóides, intervalo descrito por Bruemmer (2006), sendo que o mínimo foi de  $5095 \times 10^6$  e o máximo de  $34018 \times 10^6$ . Assim, em termos estritamente quantitativos a técnica utilizada prova ser eficaz na recolha de espermatozóides, atingindo em todos os cavalos números capazes de perfazer várias doses seminais para inseminação artificial, neste caso desde 6 a 40 doses de 800 milhões de espermatozóides/dose. No entanto, a qualidade do sémen tem igual importância na construção de uma dose inseminante.

O volume de epidídimo da porção dissecada e submetida a *flushing* não foi reportado anteriormente, segundo conhecimento do autor. Apesar de se ter obtido uma correlação entre este e o número de espermatozóides recolhidos, o autor considera que os resultados obtidos para o volume de epidídimo são pouco exatos, pois a sua medição requer um tubo com maior precisão de graduação do que o utilizado, bem como depende muito do grau de

dissecação da porção de ducto epididimário sujeita a lavagem. Seria necessário obter uma forma de realizar esta medição mais corretamente, de forma a conseguir avaliar com maior segurança a correlação entre o volume de epidídimo com os espermatozóides obtidos dessa porção.

Os valores de motilidade total obtidos antes de criopreservar mas após centrifugação e ressuspensão no diluidor de congelação foram superiores para o Botucurio® em relação ao Gent diluído, com resultados de  $64,3 \pm 3,5 \%$  e  $35 \pm 6,7 \%$ , respetivamente. Para o Bc, o valor obtido é inferior ao reportado por Papa et al. (2008), de 74,1%, e por Monteiro et al. (2011), de  $83,1 \pm 7,5 \%$ . Estes resultados podem ser devido a diferenças individuais entre os garanhões utilizados na amostra, idade, raça ou até por diferenças no processamento e análise do sémen entre laboratórios.

Após criopreservação, os valores médios de motilidade total e progressiva do grupo Bc foram de  $49,5 \pm 2,8 \%$  e  $26,8 \pm 2,6 \%$ , sendo igualmente inferiores aos reportados por Monteiro et al. (2011) ( $62,9 \pm 10,6\%$  e  $32,4 \pm 9,3\%$ ) mas superiores ao valor de MT obtido por Guimarães et al. (2012), de  $40,9 \pm 4,41 \%$ , e por Papa et al. (2008) (MT=47,6%, MP=19,6%). Pode-se afirmar que os valores de MT e MP obtidos no grupo Bc são muito satisfatórios e significativamente superiores aos do grupo Gd, de  $14,1 \pm 2,9 \%$  e  $7,1 \pm 2,5 \%$ , respetivamente. Este resultado vai ao encontro de estudos anteriores que comprovam que a incorporação de amidas nos diluidores de congelação, como único crioprotetor ou em conjunto com o glicerol, fornecem uma melhor motilidade pós-descongelação para espermatozóides da cauda do epidídimo de equino (Papa et al., 2008, Álvarez, Gil, González, Olaciregui, & Luño, 2014; Olaciregui et al., 2014) do que a utilização do glicerol isoladamente.

Os resultados da análise de integridade da membrana plasmática demonstraram que o grupo Gd obteve valores significativamente superiores aos do grupo Bc tanto para o teste de fluorescência ( $p = 0,013$ ) como para o HOST ( $p = 0,000$ ). No entanto, os valores obtidos pelo teste de coloração com sondas fluorescentes ( $40,7 \pm 2,0 \%$  para Bc e  $47,1 \pm 2,3 \%$  para Gd), foram inferiores aos valores reportados anteriormente em estudos em espermatozóides da cauda do epidídimo que utilizaram o corante eosina-negrosina (Álvarez et al., 2014; Olaciregui et al., 2014), talvez devido ao tipo de corante utilizado. Por outro lado, os valores obtidos pelo HOST,  $50,6 \pm 1,5\%$  para Bc e  $65,5 \pm 2,0\%$  para Gd, foram superiores aos relatados nos mesmos estudos. O resultado do HOST pode ter sido sobrevalorizado pela existência de caudas tumefactas espontâneas existentes no sémen antes da exposição à solução hipo-osmótica (Hossain, Osuamkpe, Hossain, & Phelps, 2010), sendo que no presente trabalho não foi efetuada uma avaliação morfológica prévia do sémen, pois o objetivo foi comparar dois diluidores de congelação para uma amostra idêntica de espermatozóides.

A superioridade do Gent na preservação da integridade de membrana de espermatozóides epididimários criopreservados, comparativamente ao Botucrio®, é um resultado interessante. Ao estudar sémen de equino recolhido por VA, após descongelação, Macedo et al. (2018) refere que a diferença entre a percentagem de espermatozóides com membrana plasmática intacta congelados com Gent ( $44,43\% \pm 2,44\%$ ) em comparação aos espermatozóides criopreservados com Botucrio® ( $40,78\% \pm 2,42\%$ ) aproximou-se da significância estatística ( $p = 0,0507$ ).

Ao testar a viabilidade espermática dos espermatozóides do epidídimo com o corante eosina-negrosina, Olaciregui et al. (2014) obteve melhores resultados para espermatozóides criopreservados em diluidores com DMF ( $69,89 \pm 8,07\%$ ) ou DMF 2,5% + GLY 2,5% ( $64,57 \pm 10,21\%$ ) do que apenas com GLY 5% ( $59,23 \pm 9,51\%$ ), já para o HOST os resultados foram idênticos entre os grupos ( $45,23 \pm 10,22\%$  para DMF + GLY, e  $48,55 \pm 12,03\%$  para GLY). Álvarez et al. (2014), no entanto, obteve resultados de viabilidade semelhantes entre os espermatozóides congelados com glicerol (5%) ( $65,22\%$ ) e GLY+DMF ( $65,78\%$ ), sendo estes melhores do que os restantes grupos testados; para o HOST, a dimetilformamida e o glicerol isolados provaram ser melhores do que a combinação de ambos. Melo et al. (2008) utilizou sondas fluorescentes para o mesmo efeito e também não obteve diferenças entre a viabilidade de espermatozóides criopreservados com Botucrio® ( $49,6 \pm 8,31\%$ ) e outros dois diluidores com 5% de glicerol.

O facto do grupo Gent diluído obter resultados superiores em termos de integridade de membrana, quer pelo teste de coloração como pelo HOST, no presente estudo, pode ser devido ao facto do protocolo de criopresevação de sémen em Botucrio®, utilizado neste trabalho, presumir um arrefecimento até aos  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  mais rápido (cerca de  $-1\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$ ) do que os espermatozóides criopreservados em Gent, de cerca de  $-0,3\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$ , sendo que o arrefecimento mais lento pode favorecer a preservação da integridade de membrana em espermatozóides equinos (Macedo et al., 2018; Salazar et al., 2011). No entanto, parece que a combinação de dimetilformamida + glicerol presente no Botucrio® não obteve grandes benefícios em termos de viabilidade em espermatozóides epididimários, atingindo no entanto resultados considerados aceitáveis.

Embora numa amostra pequena, a comparação efectuada entre os ejaculados e os espermatozóides recolhido do epidídimo demonstrou que os últimos são capazes de atingir resultados de motilidade semelhantes aos do ejaculado, após criopresevação, o que corrobora o relatado em estudos anteriores (Guimarães et al., 2012; Monteiro et al., 2011).

Por fim, é comprovada a função de armazenamento de espermatozóides férteis na cauda do epidídimo, que permite a acumulação de espermatozóides maduros para posterior ejaculação (Jones, 1998), o que se traduz numa maior recuperação de células espermáticas por lavagem da cauda do epidídimo em comparação com a colheita de sémen com vagina artificial, num só ejaculado (Granemann et al., 2006; Monteiro et al., 2011; Muradás et al.,

2006). Apenas num dos cavalos não se verificou uma diferença significativa entre o número de células obtidas pelos dois métodos de colheita, provavelmente devido a uma má técnica de colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo, acrescentando-se que esta requer alguma prática, pela sua minuciosidade, e que este indivíduo (cavalo 5 da tabela 4 e figura 11-B) foi o primeiro dos cavalos que entraram no presente estudo a ser submetido a esta técnica. Para melhor comparar o número de espermatozóides presentes na cauda do epidídimo com os existentes num único ejaculado, poderia ter-se efetuado o método de flutuação associado ao método de *flushing* retrogrado, de forma a garantir que a maioria dos espermatozóides presentes eram recolhidos. Tal não foi alvo de estudo, pois um dos objetivos era correlacionar o volume da porção sujeita a lavagem, com o número de espermatozóides.

### 3. Conclusão

Os resultados pós-descongelamento obtidos no presente estudo demonstram que a refrigeração do epidídimo por 24 horas antes da recuperação dos espermatozóides foi eficiente na preservação da viabilidade e motilidade espermática após criopreservação, conforme descrito anteriormente (Bruemmer, 2006; Bruemmer et al., 2002; Guimarães et al., 2012; James et al., 2002; Monteiro et al., 2011).

Provou-se que a técnica de colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo por *flushing* retrógrado alcança bons resultados em termos de número de espermatozóides obtidos e pode ser aplicada em qualquer laboratório certificado que permita a criopreservação posterior dos mesmos, pelo que é um processo economicamente viável tanto no caso de necessidade de preservação do património genético antes de uma castração eletiva, de forma a aumentar o stock de sémen criopreservado em vida, ou, principalmente, se for a última hipótese para um cavalo de obtenção de descendência, em caso de doença ou decisão clínica terminal. Ainda, em comparação com o sémen obtido por ejaculação, os espermatozóides epididimários podem atingir parâmetros de motilidade semelhantes. No entanto, apesar de já comprovada a sua fertilidade com resultados satisfatórios (Guasti et al., 2017; Melo et al., 2008; Monteiro et al., 2011), novos estudos que abordem a fertilidade de espermatozóides epididimários criopreservados são necessários.

Relativamente à relação entre a porção de epidídimo sujeita a lavagem e o número de células espermáticas obtido nesse segmento, o autor recomenda que esta análise seja repetida com um protocolo de medição de volume do epidídimo mais assertivo do que o aqui utilizado.

A criopreservação dos espermatozóides epididimários foi eficaz na manutenção da motilidade e viabilidade dos espermatozóides. O diluidor de congelação Botucrio® obteve resultados satisfatórios na preservação destas características, enquanto que o Gent diluído

obteve resultados fracos em termos de motilidade, pelo que não é aconselhada a sua utilização para criopreservar este tipo de espermatozóides. No entanto, o Gent diluído apresentou resultados interessantes na manutenção das propriedades da membrana plasmática, pelo que será útil que futuros estudos abordem esta questão de forma a compreender que mecanismos crioprotetores são responsáveis por estes resultados. Seria interessante desenvolver diluidores de congelação específicos para espermatozóides do epidídimo de equinos, de forma a acompanhar o avanço da biotecnologia em reprodução assistida e a maximizar o potencial fértil destes espermatozóides para utilização em inseminação artificial, ou noutras técnicas inovadoras como a ICSI.

#### 4. Bibliografia

- Abou-Haila, A., & Tulsiani, D. R. P. (2000). Mammalian sperm acrosome: Formation, contents, and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 379(2), 173–182.
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., & Medeiros, A. S. L. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science*, 89, 105–113.
- Álvarez, C., Gil, L., González, N., Olaciregui, M., & Luño, V. (2014). Equine sperm post-thaw evaluation after the addition of different cryoprotectants added to INRA 96® extender. *Cryobiology*, 69(1), 144–148.
- Amann, R. P. (2011). Functional Anatomy of the Adult Male. In A. McKinnon, E. Squires, W. Vaala, & D. Varner (Eds.), *Equine Reproduction* (Second, pp. 867–881). Wiley-Blackwell.
- Amann, R. P., Hammerstedt, R. H., & Veeramachaneni, D. N. R. (1993). The epididymis and sperm maturation: A perspective. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(4), 361–381.
- Amann, R. P., Johnson, L., & Pickett, B. W. (1977). Connection between the seminiferous tubules and the efferent ducts in the stallion. *American Journal of Veterinary Research*, 38(10), 1571–1579.
- Amann, R. P., Thompson, D. L., Squires, E. L., & Pickett, B. W. (1979). Effects of age and frequency of ejaculation on sperm production and extragonadal sperm reserves in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, (27), 1–6.
- Barker, C. A., & Gandier, J. C. (1957). Pregnancy In A Mare Resulting From Frozen Epididymal Spermatozoa. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, 21(2), 47–51.
- Bedford, J. M. (1974). Report of a workshop: maturation of the fertilizing ability of mammalian spermatozoa in the male and female reproductive tract. *Biology of Reproduction*, 11, 346–362.
- Bergin, W. C., Gier, H. T., Marion, G. B., & Coffman, J. R. (1970). A Developmental Concept of Equine Cryptorchism. *Biology of Reproduction*, 3, 82–92.
- Blach, E. L., Amann, R. P., Bowen, R. A., & Frantz, D. (1989). Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: Plasma membrane integrity and motion characteristics. *Theriogenology*, 31(2), 283–298.
- Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, L. C., & Brinsko SP, R. S. (2003). Examination of the stallion for breeding soundness. In St. Louis: Mosby (Ed.), *Manual of Equine Reproduction* (second edi, pp. 143–64).
- Bruemmer, J. E. (2006). Collection and Freezing of Epididymal Stallion Sperm. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 22(3), 677–682.
- Bruemmer, J. E., Reger, H., Zibinski, G., & Squires, E. L. (2002). Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 58(2–4), 405–407.
- Cary, J. A., Madill, S., Farnsworth, K., Hayna, J. T., Duoos, L., & Fahning, M. L. (2004). A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *The Canadian Veterinary Journal*, 45(1), 35–41.
- Clermont, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*, 52(1), 198–236.
- Colenbrander, B., Fazeli, A. R., van Buiten, A., Parlevliet, J., & Gadella, B. M. (1992).

- Assessment of sperm cell membrane integrity in the horse. *Acta Veterinaria Scandinavica. Supplementum*, 88, 49–58.
- Cooper, T. G. (2012). *The epididymis, sperm maturation, and fertilisation*.
- Cummins, J. M., & Woodall, P. F. (1985). On mammalian sperm dimensions. *Journal of Reproduction and Fertility*, 75(1), 153–175.
- Drevius, L. O., & Eriksson, H. (1966). Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Experimental Cell Research*, 42(1), 136–156.
- Farah, O. I., Cuiling, L., Jiaojiao, W., & Huiping, Z. (2013). Use of fluorescent dyes for readily recognizing sperm damage. *Journal of Reproduction & Infertility*, 14(3), 120–125.
- Garde, J., Aguado, M., Perez, S., Garrido, D., Perez-Guzman, M., & Montoro, V. (1994). Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. *Theriogenology*, 41(1), 203.
- Garner, D. L., & Johnson, L. A. (1995). Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide'. *Biology of Reproduction*, 53, 276–284.
- Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63(2), 445–457.
- Gilmore, J. A., McGann, L. E., Liu, J., Gao, D. Y., Peter, A. T., Kleinhans, F. W., & Critser, J. K. (1995). Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 53(5), 985–995.
- Granemann, L. C., Weiss, R. R., Kozicki, L. E., Muradás, P. R., & Treml, T. E. (2006). Total number of spermatozoa from stud-horses collected by means of artificial vagina and through feedback flow of the epididymis tail. *Archives of Veterinary Science*, 11(1), 73–77.
- Guasti, P. N., Monteiro, G. A., Maziero, R. R. D., Carmo, M. T., Dell'Aqua, J. A., Crespilho, A. M., ... Papa, F. O. (2017). Pentoxifylline effects on capacitation and fertility of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, 179, 27–34.
- Guimarães, T., Lopes, G., Ferreira, P., Leal, I., & Rocha, A. (2012). Characteristics of stallion epididymal spermatozoa at collection and effect of two refrigeration protocols on the quality of the frozen/thawed sperm cells. *Animal Reproduction Science*, 136(1–2), 85–89.
- Heise, A., Kähn, W., Volkmann, D. H., Thompson, P. N., & Gerber, D. (2010). Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 118(1), 48–53.
- Hemeida, N. A., Sack, W. O., & McEntee, K. (1978). Ductuli efferentes in the epididymis of boar, goat, ram, bull, and stallion. *American Journal of Veterinary Research*, 39(12), 1892–1900.
- Heninger, N. L. (2011). Puberty. In A. McKinnon, E. Squires, W. Vaala, & D. Varner (Eds.), *Equine Reproduction* (Second, pp. 1015–1025). Wiley-Blackwell.
- Herrera, C., Miragaya, H. M., Conde, P., & Hynes, V. (2006). Intracytoplasmic injection of in vitro matured equine oocytes with frozen-thawed epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, 94(1–4), 299–302.
- Hossain, A., Osuamkpe, C., Hossain, S., & Phelps, J. Y. (2010). Spontaneously developed tail swellings (SDTS) influence the accuracy of the hypo-osmotic swelling test (HOS-test) in determining membrane integrity and viability of human spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27(2–3), 83–86. <https://doi.org/10.1007/s10815-009-9375-x>
- James, A. N., Green, H., Hoffman, S., Landry, A. M., Paccamonti, D., & Godke, R. A. (2002). Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4°C for 24, 48, 72 and 96



- hours. *Theriogenology*, 58(2–4), 401–404.
- Johnson, L. (1991). Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. *Biology of Reproduction*, 44(2), 284–291.
- Johnson, L., Amann, R. P., & Pickett, B. W. (1980). Maturation of equine epididymal spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research*, 41(8), 1190–1196.
- Johnson, L., Griffin, C. E., & Martin, M. T. (2011). Spermatogenesis. In A. McKinnon, E. Squires, W. Vaala, & D. Varner (Eds.), *Equine Reproduction* (Second). Wiley-Blackwell.
- Johnson, L., & Neaves, W. B. (1981). Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biology of Reproduction*, 24(3), 703–712.
- Jones, R. (1998). Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 53, 73–84.
- Katila, T. (2001). In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 42(2), 199–217.
- Kuisma, P., Andersson, M., Koskinen, E., & Katila, T. (2006). Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 48(1), 1–8.
- Little, T. V., & Holyoak, G. R. (1992). Reproductive anatomy and physiology of the stallion. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, 8(1), 1–29.
- Macedo, S., Blieberich, M., Carvalheira, J., Costa, A., Ribeiro, F., & Rocha, A. (2018). Effects of two freezing methods and two cryopreservation media on post-thaw quality of stallion spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(2).
- Maekawa, M., Kamimura, K., & Nagano, T. (1996). Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Archives of Histology and Cytology*, 59(1), 1–13.
- Magistrini, M., Guitton, E., Levern, Y., Nicolle, J. C., Vidament, M., Kerboeuf, D., & Palmer, E. (1997). New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. *Theriogenology*, 48(7), 1229–1235.
- Melo, C. M., Papa, F. O., Fioratti, E. G., Villaverde, A. I. S. B., Avanzi, B. R., Monteiro, G., ... Alvarenga, M. A. (2008). Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, 107(3–4), 331.
- Monteiro, G. A., Guasti, P. N., Rocha, A., Martin, I., Sancler-Silva, Y., Dell'Aqua, C. P., ... Papa, F. O. (2013). Effect of Storage Time and Temperature of Equine Epididymis on the Viability, Motion Parameters, and Freezability of Epididymal Sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33, 169–173.
- Monteiro, G. A., Papa, F. O., Zahn, F. S., Dellaqua, J. A., Melo, C. M., Maziero, R. R. D., ... Guasti, P. N. (2011). Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, 127(3–4), 197–201.
- Moore, A. I., Squires, E. L., & Graham, J. K. (2005). Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, 63(9), 2372–2381.
- Morillo Rodriguez, A., Balao da Silva, C., Macías-García, B., Gallardo Bolaños, J., Tapia, J., Aparicio, I., ... Peña, F. (2012). Dimethylformamide Improves the In vitro Characteristics of Thawed Stallion Spermatozoa Reducing Sublethal Damage. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(6), 995–1002.
- Morris, L., Tiplady, C., & Allen, W. R. (2002). The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology*, 58(2–4), 643–646.
- Muradás, P. R., Weiss, R. R., Kozicki, L. E., Granemann, L. C., Santos, I. W., & Pimpão, C. T. (2006). Some viability parameters from equine spermatozoa harvested by artificial vagina and by epididymal tail washing. *Archives of Veterinary Science*, 11, 69–74.

- Neild, D. M., Chaves, M. G., F, M., Mora, N., Beconi, M., & Agüero, A. (1999). Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, (10), 721–727.
- Neild, D. M., Chaves, M. G., Flores, M., Miragaya, M. H., Gonzalez, E., & Agüero, A. (2000). The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia*, 32(6), 351–355.
- Neuhauser, S., Dörfel, S., & Handler, J. (2015). Dose-dependent effects of homologous seminal plasma on motility and kinematic characteristics of post-thaw stallion epididymal spermatozoa. *Andrology*, 3(3), 536–543.
- Nie, G. J., & Wenzel, J. G. (2001). Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. *Theriogenology*, 55(4), 1005–1018.
- Olaciregui, M., Gil, L., Montón, A., Luño, V., Jerez, R. A., & Martí, J. I. (2014). Cryopreservation of epididymal stallion sperm. *Cryobiology*, 68(1), 91–95.
- Oldenhof, H., Bigalk, J., Hettel, C., Oliveira Barros, L. de, Sydykov, B., Bajcsy, Á. C., ... Wolkers, W. F. (2017). Stallion Sperm Cryopreservation Using Various Permeating Agents: Interplay Between Concentration and Cooling Rate. *Biopreservation and Biobanking*, 15(5).
- Oldenhof, H., Gojowsky, M., Wang, S., Henke, S., Yu, C., Rohn, K., ... Sieme, H. (2013). Osmotic Stress and Membrane Phase Changes During Freezing of Stallion Sperm: Mode of Action of Cryoprotective Agents 1. *Biology of Reproduction*, 88(3), 68–69.
- Palmer, E., & Magistrini, M. (1992). Automated analysis of stallion semen post-thaw motility. *Acta Veterinaria Scandinavica. Supplementum*, 88, 137–152.
- Papa, F. O., Melo, C. M., Fioratti, E. G., Dell'Aqua, J. A., Zahn, F. S., & Alvarenga, M. A. (2008). Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, 107(3–4), 293–301.
- Pickett, B. W., Voss, J. L., & Clay, C. M. (1998). Management shuttle stallions for maximum reproductive efficiency -part 2. *Journal of Equine Veterinary Science*, 18(5), 280–287.
- Roels, K., Leemans, B., Ververs, C., Govaere, J., Hoogewijs, M., & Soom, A. Van. (2013). Collection and freezing of equine epididymal spermatozoa. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 83, 321–325.
- Rosati, I., Bebbere, D., Leoni, G., Pintus, P. P., Succu, S., Ledda, S., & Naitana, S. (2004). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vitro matured (IVM) equine oocytes with frozen/thawed epididymal spermatozoa. *15th International Congress of Animal Reproduction, Porto Seguro, Brazil*.
- Salazar, J. L., Teague, S. R., Love, C. C., Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., & Varner, D. D. (2011). Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. *Theriogenology*, 76(3), 409–418.
- Samper, J. C., Hellander, J. C., & Crabo, B. G. (1991). Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 44, 107–114.
- Schulman, M. L., Gerber, D., Nurton, J., Guthrie, A. J., Joubert, K., & Volkmann, D. H. (2003). Effects of halothane anaesthesia on the cryopreservation of epididymal spermatozoa in pony stallions. *Equine Veterinary Journal*, 35(1), 93–95.
- Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2015). Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation Cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, 20–26.
- Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2016). Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*, 169.
- Silva, P. F. N., & Gadella, B. M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells.

- Theriogenology*, 65(5 SPEC. ISS.), 958–978.
- Sisson, S., Grossman, J. D., & Getty, R. (1975). *Sisson and Grossman's The anatomy of the domestic animals*. Saunders.
- Squires, E. ., Keith, S. ., & Graham, J. . (2004). Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 62(6), 1056–1065.
- Stawicki, R. J., McDonnell, S. M., Giguère, S., & Turner, R. M. (2015). Pregnancy outcomes using stallion epididymal sperm stored at 5 °C for 24 or 48 hours before harvest. *Theriogenology*, 85(4), 698–702.
- Stout, T., Morris, L., Li, X., & R Allen, W. (2000). The effect of seminal plasma on the motility and cryopreservability of horse epididymal sperm. *Havemeyer Foundation Monograph Series*, 1, 5–7.
- Swierstra, E. E., Pickett, B. W., & Gebauer, M. R. (1975). Spermatogenesis and duration of transit of spermatozoa through the excurrent ducts of stallions. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, (23), 53–57.
- Thompson, D., & Johnson, L. (1986). Seasonal Variation in the Total Volume of Leydig Cells in Stallions Is Explained by Variation in Cell Number Rather Than Cell Size. *Biology of Reproduction*, 35, 971–979.
- Tiplady, C. A., Morris, L. H. A., & Allen, W. R. (2002). Stallion epididymal spermatozoa: Pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. *Theriogenology*, 58(2–4), 225–228.
- Toshimori, K., & Eddy, E. M. (2014). The Spermatozoon. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set* (Fourth Edi, Vol. 1, pp. 99–148). Elsevier.
- Troedsson, M. H. T., Desvousges, A., Alghamdi, A. S., Dahms, B., Dow, C. A., Hayna, J., ... Buhi, W. C. (2005). Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science*, 89(1–4), 171–186.
- Varner, D. D., & Johnson, L. (2011). From a Sperm's Eye View: Revisiting Our Perception of this Intriguing Cell. In A. McKinnon, E. Squires, W. Vaala, & D. Varner (Eds.), *Equine Reproduction* (Second, pp. 909–990). Wiley-Blackwell.
- Vidament, M., Daire, C., Yvon, J. M., Doligez, P., Bruneau, B., Magistrini, M., & Ecot, P. (2002). Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology*, 58(2–4), 249–251.
- World Health Organization. (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. World Health Organization.